

Departement Kleintiere der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor a.i.: Prof. Dr. med. vet. Ulrich Hübscher

Arbeit unter der Leitung von Dr. med. vet. Marianne Richter

**Effekt der Vakzinierung mit rekombinantem felinen Herpesvirus bei latent
FeHV-1 infizierten Katzen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Lea Schudel

Tierärztin
von Wiesendangen, Schweiz

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Bernhard Spiess, Referent

Prof. Dr. med. vet. Mathias Ackermann, Korreferent

Zürich 2006

Probleme kann man nie mit derselben Denkweise lösen,
durch die sie entstanden sind.

Albert Einstein

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	1
2 Abkürzungsverzeichnis	3
3 Zusammenfassung	5
4 Summary	6
5 Teil A: Literaturübersicht	7
5.1 Katzenschnupfenkomplex	7
5.2 Felines Herpesvirus 1 (FeHV-1)	7
5.2.1 Viruseigenschaften und -morphologie	8
5.2.2 Pathogenese	8
5.2.2.1 Lokale Entwicklung	8
5.2.2.2 Systemische Auswirkungen	9
5.2.2.3 Augenveränderungen	9
5.2.3 Klinik	9
5.2.3.1 Akute Primärinfektionen	9
5.2.3.2 Reproduktive und perinatale Erkrankungen	10
5.2.3.3 Dermatologische Symptome	10
5.2.3.4 Chronische rezidivierende Infektionen	10
5.2.4 Epizootologie	11
5.2.4.1 Virusausscheidung und -übertragung	11
5.2.4.2 Inkubationszeit und Krankheitsverlauf	12
5.2.5 Latenz bei FeHV-1 Infektionen	14
5.2.5.1 Reaktivierung von latenten FeHV-1 Infektionen	15
5.2.6 Immunantwort auf die Infektion mit FeHV-1	16
5.2.7 Nachweis von FeHV-1 Infektionen	17
5.2.7.1 Nachweis von latenten Infektionen	17
5.2.8 Bildung von Serumantikörpern gegen das FeHV-1	18
5.2.8.1 Antikörperbildung nach experimenteller Infektion	18
5.2.8.2 Antikörperbildung nach Impfung gegen das FeHV-1	18
5.2.9 Therapie von FeHV-Infektionen bzw. dem Katzenschnupfen	19
5.2.10 Impfung	20
5.2.11 Prävention	22
5.3 Impfstoffentwicklung mit Hilfe von BACs	23
6 Teil B: Projekt	25
6.1 Einleitung	25
6.2 Material und Methoden	27
6.2.1 Katzen	27
6.2.2 Zellen	27
6.2.3 Virus	27
6.2.4 Interferon	28
6.2.5 Klinische Untersuchung	28
6.2.6 Augenuntersuchung	28

6.2.7	Virusnachweis	28
6.2.7.1	Virusisolation	28
6.2.7.2	DNA-Extraktion	29
6.2.7.3	PCR	30
6.2.8	Virustitration	30
6.2.9	Blutentnahme	31
6.2.10	Mx-Nachweis mittels Western Blot	31
6.2.11	Antikörpernachweis mittels Serumneutralisationstest	32
6.2.12	Versuchsplan	33
6.3	Resultate	34
6.3.1	Klinische Symptome	34
6.3.2	Augensymptome	34
6.3.3	Verlauf der Virusausscheidung	34
6.3.3.1	Ergebnisse der Virusisolation	34
6.3.3.2	Ergebnisse der TaqMan-PCR	37
6.3.3.3	Übersicht Virusausscheidung	40
6.3.4	Verlauf der Antikörpertiter	40
6.3.5	Verlauf der Mx-Ausscheidung	41
6.4	Diskussion	42
6.4.1	Klinik	42
6.4.2	Virusausscheidung	42
6.4.3	Antikörperbildung	44
6.4.4	Mx-Protein- bzw. Interferonbildung	45
6.4.5	Fazit	45
7	Literaturverzeichnis	47

2 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BAC	bacterial artificial chromosome (künstliches Bakterienchromosom)
BHV	bovines Herpesvirus
CPE	cytopathic effect (zytopathischer Effekt)
CRFK	Crandell-Reese feline Kidney
CT	cycle threshold value (Schwellenwert-Zyklus)
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EHV	equines Herpesvirus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	foetal calf serum (fötales Kälberserum)
FCV	felines Calicivirus
FeLV	felines Leukosevirus
FeHV	felines Herpesvirus
FIV	felines Immundefizienzvirus
FPV	felines Parvovirus
FRV	felines Rhinotracheitisvirus (alte Bezeichnung für FeHV)
GFP	green fluorescent protein (grün-fluoreszierendes Protein)
gG	Glykoprotein G
HSV	Herpes Simplex Virus (humanes Herpesvirus)
Lnn	Lymphknoten
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RCF	relative centrifugal force (relative Zentrifugalbeschleunigung)
rFeHV Δ gG	rekombinantes felines Herpesvirus ohne Glykoprotein G
SNT	Serumneutralisationstest
SPF	spezifisch pathogenfrei
STT	Schirmer Tränentest
TCID	tissue culture infective dose
WB	Western Blot

3 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, den Effekt einer okulären Vakzinierung mit einem rekombinanten Glykoprotein G-defizienten feline Herpesvirus (rFeHV Δ gG) in latent FeHV-1 infizierten Katzen zu untersuchen. Anstelle des Glykoproteins G (gG) wurde ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Damit war die Unterscheidung zwischen dem rekombinanten und dem Wildtypvirus mittels Virusisolation und PCR möglich. Das rFeHV Δ gG wurde den latent FeHV-1 infizierten Katzen ins rechte Auge inokuliert. Das linke Auge diente als Kontrollauge.

Die Katzen zeigten nach der Inokulation mit dem rFeHV Δ gG weder klinische noch Augensymptome. Während das rFeHV Δ gG im Tränensekret am Tag 1 post inoculationem (pi) mittels TaqMan-PCR bei allen Katzen im rechten Auge nachweisbar war, war die Virusisolation auf CRFK-Zellen nur bei 4/9 Katzen erfolgreich. Alle Virusisolate zeigten CPE-Läsionen mit Fluoreszenz mit Ausnahme des Isolates einer Katze, das fluoreszierende und nicht-fluoreszierende CPE-Läsionen aufwies. In der konventionellen PCR wurde jedoch nur das rFeHV Δ gG nachgewiesen. Die Antikörpertiter begannen ab Tag 7 pi anzusteigen und erreichten ein Maximum zwischen Tag 28 und 57 pi.

Die Inokulation des rFeHV Δ gG löst in latent mit FeHV-1 infizierten Katzen weder eine Reaktivierung des latenten FeHV-1 noch klinische Symptome aus und bewirkt einen anamnестischen Antikörperanstieg. Es wäre sinnvoll abzuklären, inwieweit Katzen nach einer primären okulären Vakzinierung mit rFeHV Δ gG gegen eine Infektion mit FeHV-1 geschützt sind.

4 Summary

The aim of this study was to investigate effects of ocular vaccination with a recombinant glycoprotein G-deficient feline herpesvirus (rFeHV Δ gG) in latently FeHV-1 (wild-type) infected cats. Instead of the glycoprotein G (gG) a green-fluorescent protein (GFP) was expressed by the rFeHV Δ gG, thus allowing differentiation between wild-type and recombinant virus by using either virus isolation or PCR.

The right eye of latently FeHV-1 infected cats was inoculated with rFeHV Δ gG, while left eye served as control.

Following inoculation with rFeHV Δ gG, cats did not show any clinical or ocular symptoms. Whereas 1 day post inoculation (dpi) virus DNA was obtained from tear-samples of 9/9 cats by TaqMan PCR, isolation of virus on CRFK cells was successful only in 4/9 cats from the right eye. All virus isolates produced fluorescing CPE lesions with the exception of one isolate of 1 cat, that showed both, fluorescent and non-fluorescent CPE lesions at 1 dpi. However, using conventional PCR, only rFeHV Δ gG has been detected. FeHV-1 neutralizing antibody titres started to rise from 7 dpi in all cats and peaked between day 28 and 57 post inoculation.

Inoculation of rFeHV Δ gG does not seem to induce reactivation of latent FeHV-1 or clinical symptoms in cats. Immunogenicity has been shown by an anamnestic antibody response following ocular inoculation with rFeHV Δ gG in latently FeHV-1 infected cats. Further investigations concerning protective effects of the rFeHV Δ gG vaccine candidate following experimental challenge are suggested.

5 Teil A: Literaturübersicht

5.1 Katzenschnupfenkomplex

Für infektiöse Erkrankungen der oberen Atemwege und/oder der Maulschleimhaut sowie der Augen bei der Katze kommen verschiedene Krankheitserreger in Frage. Neben dem Felinen Herpesvirus Typ 1 (FeHV-1) ist als weiterer häufiger Erreger das Feline Calicivirus zu nennen. Als primäre nichtvirale Erreger des Katzenschnupfenkomplexes werden Chlamydien angesehen. Durch Mykoplasmen oder bakterielle Sekundärinfektionen kann der Krankheitsverlauf bei allen oben aufgeführten Primärinfektionen kompliziert werden.

5.2 Felines Herpesvirus 1 (FeHV-1)

Das zu den Alphaherpesvirinae zählende FeHV-1 scheint weltweit in der Katzenpopulation verbreitet zu sein [Crandell, 1973]. Zudem ist es eine der häufigsten Viruserkrankungen der Katzen [Gaskell et al., 1985]. In einer Studie von Dawson et. al. von 1998 wiesen 97 % der Katzen aus Privathaushalten FeHV-1 IgG-Antikörper auf und 95 % hatten einen Titer über 32 [Dawson et al., 1998]. Diese Titer waren höher als man sie nach einer Impfung erwarten würde, was vermuten lässt, dass eine Reinfektion mit FeHV-1 häufig auftritt und die Impfung dadurch geboostert wird.

Im Jahre 1958 wurde das Virus erstmals durch Crandell und Maurer isoliert [Crandell and Maurer, 1958]. Da es Nase und Trachea besiedelt, wurde es zunächst als „felines Rhinotracheitisvirus“ (FRV) bezeichnet, bis es aufgrund seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften in die Gruppe der Herpesviren eingestuft wurde. Die Krankheit wurde bei 5-10 Wochen alten Bauernhofkätzchen beobachtet, welche plötzlich Symptome wie Konjunktivitis, Epiphora, Nasenausfluss und Niesen zeigten. Der Erreger wurde aus dem Nasopharynx und den Konjunktiven isoliert. In der Schweiz wurde das Virus erstmals 1963 von Bürki et al. nachgewiesen [Bürki et al., 1964].

Das Virus ist speziesspezifisch und Erkrankungsfälle wurden bisher nur bei Katzen gefunden, jedoch wurde das Virus auch aus dem Thymus und der Milz eines Hundewelpen mit staupeähnlichen Symptomen, Pankreasatrophie und Diabetes mellitus isoliert [Kramer et al., 1991]. Infektionsversuche ergaben zwar den Aufbau neutralisierender Antikörper, die betreffenden Hunde zeigten aber keine klinischen Symptome. Zudem vermehrt sich FeHV-1 nur in Zellkulturen felines Ursprungs [Crandell, 1971].

Der Erreger infiziert die Epithelzellen der Nase, des Pharynx, der Trachea und der Augen; dort verursacht er Epitheliolyse und Nekrose [Bistner et al., 1971].

Typischerweise tritt die Erstinfektion bei Jungtieren auf, vor allem im Alter zwischen 8 und 12 Wochen, wenn die maternalen Antikörper abnehmen. Ungefähr 80 % der betroffenen Katzen bleiben latent infiziert. Bei den latent infizierten Tieren kommt es häufig zu einer spontanen Reaktivierung mit Virusausscheidung [Gaskell and Povey, 1977].

Die geringe Immunantwort, die Persistenz im Körper in latenter Form nach einer Primärinfektion und die Fähigkeit zur Reaktivierung durch Stress (Geburt, Laktation,

Ausstellungen, Tierheime usw.) oder Immunsuppression mit erneuten klinischen Symptomen sind typische Eigenschaften der Herpesviren [Nasisse, 1982].

5.2.1 Viruseigenschaften und -morphologie

FeHV-1 ist mit 180-200 nm ein relativ grosses, behülltes DNA-Virus. Aufgebaut ist es aus einer DNA-Doppelhelix, die von einer Proteinhülle, dem Kapsid, umgeben wird. Die äussere Hülle bildet eine Phospholipidschicht, die aus der Zellmembran der Wirtszelle gebildet wird. Darin sind verschiedene virale Glykoproteine eingelagert. Der Lipidanteil der äusseren Hülle ermöglicht die Inaktivierung des Virus durch herkömmliche Reinigungsmittel sowie Hypochlorit und Ammoniumverbindungen [Ditchfield and Grinyer, 1965].

Das Virus kann in Katzenzellkulturen, jedoch nicht in anderen Systemen - wie Eier oder Labortiere - angezüchtet werden [Crandell, 1971]. Zudem löst es auf Zellkultur einen zytopathischen Effekt (CPE = cytopathic effect) aus, der durch intranukleäre Einschlusskörperchen charakterisiert ist.

FeHV-1 ist in der Umwelt labil und überlebt nur 18 Stunden bei 15 °C und feuchter Umgebung und an trockenen Orten sogar nur 12 Stunden [Povey, 1979].

5.2.2 Pathogenese

Die Infektion mit dem FeHV-1 kann sowohl oral, nasal als auch konjunktival erfolgen [Povey, 1969]. Die Virusreplikation findet im Kern der befallenen Zellen statt, hier finden sich auch die für die Herpesviren typischen Einschlusskörperchen, die bereits von Crandell und Maurer erwähnt wurden [Crandell and Maurer, 1958]. Der Pathomechanismus entspricht einer Zytolyse, wodurch wiederum Virus freigesetzt wird, das benachbarte Zellen befallen kann.

5.2.2.1 Lokale Entwicklung

Bei einer experimentellen Infektion von Katzen, stellte man fest, dass sich das FeHV-1 vor allem im Konjunktivalepithel repliziert [Nasisse et al., 1989b]. Die Viren führen innerhalb von zwei Tagen zu einer Nekrose der befallenen Zellen mit einem Höhepunkt zwischen Tag 7 und 10 post infectionem [Hoover et al., 1970]. Mit der Zerstörung der Zellen (Zytolyse) wird vermehrt Virus freigesetzt, welches sich danach rasch weiter in den Epithelien der Konjunktivalsäcke, des Oropharynx, der Trachea, der Bronchien und der Bronchioli verbreitet und katarrhalische Entzündungssymptome bedingt. Nach Lindt kann die katarrhalische Form auch ohne bakterielle Sekundärinfektion in eitrige Verlaufsformen übergehen [Lindt, 1965]. Povey beschreibt, dass es durch Sekundärinfektionen mit fakultativ pathogenen Bakterien auch zu eitrigen Pneumonien und Pleuritiden kommen kann [Povey, 1969].

Zusätzlich zu den entzündlichen Schleimhautveränderungen kann es zu rarefizierenden Chondro- und Osteodystrophien der Konchien und Nasenwände kommen. Bei experimentellen Infektionen wurden diese bereits ab Tag 5 post infectionem gefunden [Lindt, 1965]. Die Entstehung von Geschwüren wird auch in der Maulhöhle, speziell auf dem Zungenrücken, häufiger beobachtet [Karpas and Routledge, 1968; Povey, 1969].

5.2.2.2 Systemische Auswirkungen

Im Jahr 1970 infizierten Hoover und Mitarbeiter 8 Wochen alte SPF-Katzenwelpen mit FeHV-1 [Hoover et al., 1970]. Fieber trat bei den Tieren lediglich an Tag 3 bis 4 post infectionem auf, während Reubel et al. bei experimentell FeHV-1 infizierten SPF-Katzen einen biphasischen Fiebertverlauf mit Fieberschüben an den Tagen 3 und 7 post infectionem beobachteten [Reubel et al., 1992]. In Verbindung mit dem ersten Fieberschub zu Beginn der Erkrankung konnten Bürki et al. und auch Hoover et al. bei einzelnen Katzen Virämien feststellen [Bürki et al., 1964; Hoover et al., 1970].

5.2.2.3 Augenveränderungen

An den Augen kommt es neben einer Konjunktivitis auch zu einem Befall der Hornhaut. Das Virus führt hier zu Keratitiden, teilweise auch zur Bildung von Ulzerationen [Karpas and Routledge, 1968; Nasisse et al., 1995; Nasisse et al., 1989b]. Verglichen mit dem ausgeprägten Tropismus des FeHV-1 für konjunktivale Epithelzellen, sind Läsionen der Hornhaut nicht so häufig [Nasisse, 1990]. Beteiligungen der Hornhaut (Keratitiden) sind häufiger bei rekurrierenden FeHV-1-Infektionen zu sehen [Bistner et al., 1971]. Zuerst treten kleine punktförmige Erosionen auf und nach Ausbreitung der Herpesviren kommt es zur Nekrose benachbarter Epithelzellen mit der Bildung dendritischer oder geographischer Hornhautgeschwüre. Das Ausmass der Veränderungen ist vor allem von den Immunreaktionen gegenüber dem FeHV-1 abhängig. So stellten Nasisse et al. fest [Nasisse et al., 1989b], dass nach experimenteller, primärer konjunktivaler Infektion mit verschiedenen Herpesvirusstämmen bei 10 Katzen neben Konjunktivitiden lediglich punktuelle und dendritische epitheliale Läsionen der Hornhaut auftrat. Hingegen zeigten 10 Katzen, deren Immunsystem vor Infektion mit dem FeHV-1 durch Behandlung mit Betamethason (ein Glukokortikoidderivat) beeinflusst wurde, neben Konjunktivitiden auch chronische (> 60 Tage andauernde) Keratitiden mit Ulzerationen, interstitiellen Ödemen, tiefer Vaskularisation, sowie verminderte Tränenproduktion. Bistner et al. konnten bei den von ihnen untersuchten stromalen Keratitiden kein FeHV-1 nachweisen und vermuteten eine Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber viralen Antigenen oder den Entzündungsprodukten [Bistner et al., 1971]. Nasisse et al. konnten im Hornhautstroma von SPF-Katzen lediglich nach intrastromaler Inokulation, nicht aber nach Einträufeln der Virussuspension ins Auge Virusantigen im Stroma nachweisen [Nasisse et al., 1989b]. Beide Autoren folgerten daraus, dass sich das FeHV-1 nur im Epithel, aber nicht im Stroma repliziert.

5.2.3 Klinik

5.2.3.1 Akute Primärinfektionen

Der Grossteil von primären, akuten FeHV-1-Infektionen tritt bei Neugeborenen und Jungkatzen auf. In diesen Fällen ist vor allem der obere Respirationstrakt befallen und die Katzen zeigen typischerweise Niesen, Augen- und Nasenausfluss. Sofern die Katzen eine adäquate Immunreaktion machen, ist die Infektion selbstlimitierend. Die klinischen Symptome werden während 14-20 Tagen beobachtet [Nasisse, 1990]. Faktoren wie die Virulenz des Virusstamms, die Infektionsdosis, das Alter, der Genotyp und der Ernährungszustand der Katze, der Immunstatus und bestehende Infektionen mit dem feline Immundefizienzvirus (FIV) oder dem feline Leukämievirus

(FeLV), beeinflussen den Verlauf der Infektion [Gaskell and Bennett, 1996]. Meist zeigen die Katzen Niesen, Salivation, Inappetenz und Fieber [Crandell, 1973; Gaskell and Bennett, 1996]. Bei Fortschreiten der Krankheit entwickeln sich ausgeprägter Augen- und Nasenausfluss, Konjunktivitis, epitheliale Keratitis und manchmal Dyspnoe und Husten. Auf der Zunge können Ulzera auftreten. Meistens tritt nach spätestens zwei bis drei Wochen eine spontane Heilung ein. Wenn eine starke Nekrose der Schleimhäute oder Nasenmuscheln vorhanden ist, kann dies zu chronischer Rhinitis und Sinusitis führen. Bei jungen oder immunsupprimierten Tieren kann es zu einer Virämie kommen, die sogar lebensbedrohend sein kann [Kraft and Dürr, 2003].

Die in der Literatur am häufigsten angegebenen Krankheitssymptome bei FeHV-1-Infektionen sind Niesen und Nasenausfluss, teilweise auch Husten, Konjunktivitis mit Augenausfluss, epitheliale Keratitis, Hornhautulzera, Fieber [Bartholomew and Gillespie, 1968; Bistner et al., 1971; Crandell and Maurer, 1958; Crandell et al., 1961; Gaskell and Povey, 1979a; Hoover and Griesemer, 1971; Hoover et al., 1970; Karpas and Routledge, 1968; Lindt, 1965; Orr et al., 1980; Reubel et al., 1992], Gingivitis und / oder Ulzera im Maulbereich und der Zunge [Karpas and Routledge, 1968; Reubel et al., 1992], Anorexie [Bartholomew and Gillespie, 1968; Hoover and Griesemer, 1971; Hoover et al., 1970; Povey, 1969], sowie Aborte oder Geburt lebensschwacher Welpen [Bittle and Peckham, 1971; Hoover and Griesemer, 1971].

Die Krankheitssymptome können durch bestehende Organerkrankungen, bakterielle Sekundärinfektionen [Povey, 1969] oder durch bereits bestehende andere Viruserkrankungen wie z.B. FIV-Infektionen verstärkt werden [Reubel et al., 1992].

5.2.3.2 Reproductive und perinatale Erkrankungen

Das FeHV-1 kann Ursache von schweren Erkrankungen bei jungen Katzen sein. Hickman et al. beschrieben eine neonatale Mortalität bis zu 60 % bei Katzenwelpen deren Muttertiere während der Trächtigkeit an FeHV-1 erkrankt waren [Hickman et al., 1994]. Nur eine von den 51 erkrankten tragenden Katzen abortierte ein Jungtier, die anderen zwei kamen 3 Wochen später gesund zur Welt. Bisher erfolgten nach experimentellen intranasalen Infektionen zwar Aborte, aber FeHV-1 konnte weder aus den Uteri, noch den Plazenten oder den Föten isoliert werden [Hoover and Griesemer, 1971]. Es ist unklar, ob die Aborte durch die Infektion des Reproduktionstraktes oder sekundär aufgrund der allgemeinen Schwächung der Tiere durch das Virus entstanden.

5.2.3.3 Dermatologische Symptome

Hargis und Ginn konnten FeHV-1 als Ursache von ulzerativer Dermatitis im Gesicht und an der Nase nachweisen [Hargis and Ginn, 1999]. Histologische Untersuchungen zeigten Veränderungen (Nekrose, eosinophile Infiltration und intranukleäre Einschlusskörperchen), die auch beim eosinophilen Granulomkomplex oder bei Hypersensitivität gegenüber Insektenstichen gefunden werden können.

5.2.3.4 Chronische rezidivierende Infektionen

Bei adulten Katzen, die früher eine akute FeHV-1-Infektion durchgemacht hatten, sind nach Rezidiven deutlichere Augensymptome vorhanden. Obwohl auch eine Reinfektion mit einem anderen FeHV-Stamm möglich wäre, ist anzunehmen, dass die

Augensymptome durch Reaktivierung des latenten Virus ausgelöst werden [Bistner et al., 1971; Nasisse, 1982]. Im Gegensatz zur Primärinfektion sind bei Rezidiven in der Regel keine Symptome des Respirationstraktes vorhanden und die Augenveränderungen sind meist unilateral [Nasisse, 1990]. Häufig sind die Symptome auf Konjunktivitis und stromale Keratitis von unterschiedlichem Schweregrad beschränkt. In vielen Fällen sieht man nur eine milde konjunktivale Hyperämie mit intermittierendem Augenausfluss. Die Klinik einer chronischen Infektion zieht sich über Wochen bis Monate und Rezidive sind häufig. Bistner et al. konnten bei den von ihnen untersuchten stromalen Keratitiden kein FeHV-1 nachweisen und vermuteten eine Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber viralen Antigenen oder den Entzündungsprodukten [Bistner et al., 1971]. Streilein et al. glaubten, dass die humane Herpeskeratitis eine immunpathogene Erkrankung sei, bei der Gewebeerstörung und Blindheit eher durch die Immunantwort auf Antigene im kornealen Gewebe entsteht als durch die Toxizität des Humanen Herpesvirus (HSV) selbst [Streilein et al., 1997]. Akova et al. konnten im Tiermodell mit HSV zeigen, dass stromale Herpeskeratitis eine immunpathologische Erkrankung ist, bei der CD4⁺ T-Lymphozyten beteiligt sind [Akova et al., 1993].

5.2.4 Epizootologie

5.2.4.1 Virusausscheidung und -übertragung

Die Infektion mit FeHV-1 erfolgt nasal, oral oder konjunktival. Die Übertragung des Virus erfolgt direkt über Sekrete, ist aber auch indirekt über Vektoren möglich [Gaskell and Bennett, 1996]. Hauptorte der viralen Replikation sind die Nasengänge, der weiche Gaumen (palatum molle), die Konjunktiven, die Tonsillen und etwas seltener die Trachea [Gaskell and Povey, 1979b]. Die Ausbreitung im Organismus findet entlang der Nervenbahnen statt [Sussman et al., 1997].

Das Virus kann bereits 24 Stunden post infectionem in Augen-, Nasensekret und Speichel nachgewiesen werden und die Ausscheidung dauert ein bis drei Wochen. Das Virus zeigt eine temperaturrestriktive Vermehrung und repliziert sich vorwiegend in den vergleichsweise „kühlen“ Schleimhautepithelien der Nasensepten, der Nasenschnecken des Nasopharynx und der Tonsillen. Durch Vermehrung in den Epithelzellen kommt es zu entzündlichen Veränderungen und fokalen Nekrosen im oberen Respirationstrakt und am Auge, wodurch wiederum Virus freigesetzt wird. Eine systemische Infektion mit Virämie kommt jedoch nur bei Welpen mit Untertemperatur vor [Gaskell and Bennett, 1996]. Eine Virämie im adulten Organismus ist selten, da bei über 37 °C Körpertemperatur die Vermehrung des FeHV sistiert.

Die Ausscheidung von infektiösem Virus mit dem Nasen- oder Augensekret dauert nach experimenteller Infektion 9 bis 19 Tage [Lindt, 1965]. Gaskell und Povey ermittelten für latent infizierte Katzen mit rekurrierenden Krankheitsschüben eine Dauer der Virusausscheidung zwischen 4 und 9 Tagen [Gaskell and Povey, 1973]. Die Ausscheidung muss in diesen Zeiträumen nicht permanent erfolgen. Es wurde über Fälle berichtet, in denen Virus intermittierend ausgeschieden wurde [Gaskell and Povey, 1977].

Die horizontale Übertragung des FeHV-1 erfolgt normalerweise vor allem durch das Versprühen virushaltiger Sekrete beim Niesen oder Husten (Tröpfcheninfektion) und durch den Speichel [Kraft and Dürr, 2003]. Gaskell und Povey konstatierten 1982, dass für eine Ansteckung ein engerer Kontakt wie z.B. gegenseitiges Belecken, Put-

zen und gemeinsames Benutzen von Futtergefäßen notwendig sei, da eine Tröpfcheninfektion durch niesende Virausscheider nur auf kurze Entfernungen erfolge [Gaskell and Povey, 1982].

Die Möglichkeit der vertikalen Übertragung wird noch diskutiert. Bittle und Peckham vermuteten, dass auch eine vertikale Übertragung möglich ist. In einem Experiment wurden Muttertiere in der späten Trächtigkeit (1 bis 12 Tage prae partum) vaginal mit dem FeHV-1 infiziert, worauf einige der jungen Kätzchen postnatal an generalisierten FeHV-1 Infektionen starben [Bittle and Peckham, 1971]. Diese Welpen wurden bereits mit respiratorischen Krankheitssymptomen geboren. Andere Untersucher berichteten über das Auftreten von Aborten bei tragenden Katzen nach FeHV-1 Infektionen [Hoover and Griesemer, 1971; Lindt, 1965]. Bis heute ist noch nicht völlig klar, ob es sich um einen Befall des Uterus und eine intrauterine Infektion der Föten handelt oder ob sich die Welpen von infizierten Katzen intra partum anstecken. Bisher erfolgten nach experimentellen intranasalen Infektionen zwar Aborte, aber FeHV-1 konnte weder aus den Uteri, noch den Plazenten oder den Föten isoliert werden [Hoover and Griesemer, 1971]. Es wäre also auch möglich, dass die Aborte eine unspezifische Folge der schweren, entkräftenden Erkrankung der oberen Atemwege darstellen. Auch Gaskell und Povey fanden keinen Fall von diaplazentarer Infektion bei 10 latent FeHV-1 infizierten Kätzinnen und deren Welpen [Gaskell and Povey, 1982]. Jedoch konnten sie während der Laktation Virausscheidung bei 4 von 10 Katzenmüttern nachweisen. 2 von insgesamt 11 Welpen schieden während 1 Tag Virus aus. Bei 2 weiteren Welpen konnte man 15 beziehungsweise 25 Tage lang Virus nachweisen. Diese Katzen wurden zu latenten Virus-Trägern. Keiner der 4 Welpen zeigte klinische Erkrankungssymptome, obwohl nur eines der Tiere zum Zeitpunkt der Virausscheidung maternale Antikörper aufwies.

5.2.4.2 Inkubationszeit und Krankheitsverlauf

Über die Länge der Inkubationszeit und die Krankheitsdauer werden von verschiedenen Untersuchern sowohl bei natürlichen als auch bei experimentellen FeHV-1 Infektionen unterschiedliche Daten angegeben. Die Angaben bezüglich Inkubationszeit bei der natürlichen Infektion variieren zwischen 2 und 10 Tagen, während sie bei experimentellen Infektionen mit 1 bis 6 Tagen deutlich niedriger blieben.

Gaskell und Povey stellten fest, dass die Länge der Inkubationszeit nach experimenteller Infektion von der Virulenz des verwendeten Stammes, aber auch von der Infektionsdosis abhängig ist. Die Infektionsdosis variiert bei natürlichen Infektionen stark und könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Inkubationszeitangaben darstellen [Gaskell and Povey, 1979a].

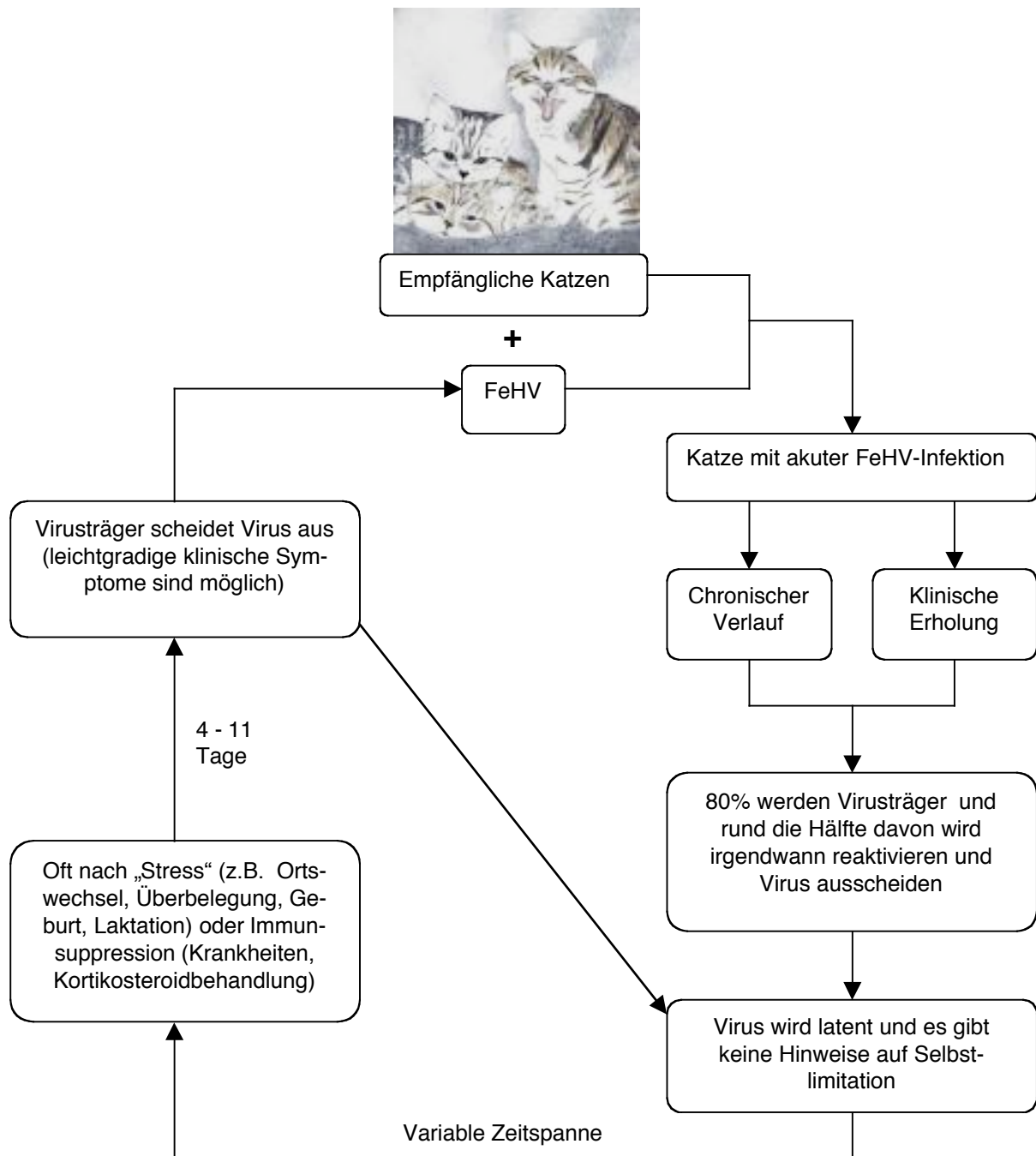
Auch die Krankheitsdauer wird unterschiedlich beschrieben. Bei natürlich infizierten Tieren soll sie zwischen 10 und 21 Tagen liegen - bei experimentellen Infektionen werden 10 bis 42 Tage angegeben. Diese Zahlen gelten für akute und unkomplizierte Erkrankungen. Lindt et al. beobachteten aber auch Fälle, in denen eine eitrige Rhinitis nach dieser Zeit in ein chronisches Stadium überging, für Monate bis Jahre bestand und therapeutisch kaum beeinflussbar war [Lindt, 1965]. Gaskell und Povey konnten feststellen, dass ca. 20 % der infizierten Katzen das FeHV-1 nach der primären Infektion eliminiert hatten, der Rest der Tiere aber latent infiziert geblieben war [Gaskell and Povey, 1977].

Neben den Erkrankungsfällen, bei denen klinisch erkrankte Katzen Virus ausscheiden, existieren (vor allem bei Reaktivierung latenter Infektionen) sowohl Verlaufsfor-

men mit leichter klinischer Symptomatik ohne Virusausscheidung, als auch eine Virusausscheidung ohne klinische Symptome [Gaskell and Povey, 1977].

Die Dauer und Schwere der Erkrankung werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst, deren wichtigster sicherlich das Alter des betroffenen Tieres ist. Mehrere Untersucher stellten fest, dass Jungtiere meist schwerwiegender erkranken als ältere Katzen [Hickman et al., 1994; Kraft and Dürr, 2003; Povey, 1969]. Hickman et al. untersuchten den Ausbruch einer eingeschleppten Katzenschupfeninfektion in zwei SPF-Katzenzuchten. Die Erkrankung hatte eine relativ geringe Morbidität - nur ca. 50 % der empfänglichen Tiere zeigten klinische Symptome. Auch wiesen die erkrankten Tiere nur milde Symptomatik auf, vorwiegend wurden Konjunktivitiden beobachtet. Aborte bei trächtigen Katzen traten nicht auf. Bei Neonaten, deren Muttertiere während der Trächtigkeit und/oder frühen Laktation erkrankten, war die Mortalität jedoch hoch. Neben den klinisch apparenten waren in dem Bestand auch subklinische Verlaufsformen aufgetreten, da alle zufällig ausgewählten symptomlosen Katzen Antikörper gegen das FeHV-1 aufwiesen.

Diagramm 5.1: Epizootologie von FeHV [Gaskell and Bennett, 1996]



5.2.5 Latenz bei FeHV-1 Infektionen

Auch bei Katzen ist das Verschwinden der klinischen Symptome nach einer primären FeHV-Infektion nicht mit einer Heilung gleichzusetzen. Wie bei Herpesvirusinfektionen anderer Tierspezies und des Menschen kann das Virus im Organismus persistieren. Über 80 % der mit FeHV-1 infizierten Katzen entwickeln eine latente Infektion. Dabei befindet sich das Virus in einem nichtreplikativen Status, der lebenslang bestehen bleibt, wobei jederzeit eine Reaktivierung vorkommen kann [Gaskell and Povey, 1977; Reubel et al., 1993]. Allgemein können bis zu 30 % der gesund erscheinenden Katzen latent mit FeHV-1 infiziert sein [Ellis, 1981]. Gaskell und Povey induzierten die Reaktivierung durch Kortikosteroidbehandlung und überprüften die Virus-

ausscheidung [Gaskell and Povey, 1977]. Der Ort der Viruspersistenz im Organismus ist noch nicht endgültig geklärt. Bei akut erkrankten Tieren ist es in der Regel möglich, das Virus aus Augen-, Nasen- oder Mundhöhlentupfern sowie aus Gewebeproben vor allem aus dem Siebbeinlabyrinth, dem weichen Gaumen, den Tonsillen, weiteren Anteilen des Nasen-Rachen-Raumes und teilweise auch aus den tieferen Atemwegen zu isolieren [Gaskell and Povey, 1979b; Hoover et al., 1970; Karpas and Routledge, 1968]. Bei latent infizierten Katzen gelingt die Virusisolation jedoch nur selten [Gaskell and Povey, 1979b].

Da die meisten Alphaherpesviren eine Latenz im sensorischen Ganglion entwickeln, wurde das vom FeHV-1 auch erwartet. Dieses Thema wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert, da man mit traditionellen Gewebekultur-Techniken kein Virus aus dem Trigeminalganglion von latent infizierten Katzen isolieren konnte [Ellis, 1982; Gaskell and Povey, 1979b]. 1985 wurde bewiesen, dass das FeHV-1 im Trigeminalganglion eine Latenz entwickeln kann [Gaskell et al., 1985]. In den Ganglien von 3 von 17 latent infizierten Katzen wurde das Virus erfolgreich in Gewebekultur nachgewiesen. Es ist jedoch möglich, dass diese Methoden der Virusisolation mittels Gewebekultur nur teilweise funktionieren. Studien über andere Herpesviren weisen darauf hin, dass eine latente Infektion in anderen Geweben wie dem Hornhautepithel oder dem Hornhautstroma auftreten könnte [Abghari and Stulting, 1988; Sabbaga et al., 1988].

Selbst regelmässig geimpfte Tiere können nach FeHV-1 Infektion zu Virusträgern werden, ohne je klinische Symptome gezeigt zu haben. Auch junge Katzen können unter dem Schutz maternaler Antikörper zu Virusträgern werden [Gaskell and Povey, 1977].

Aus einer Studie von Gaskell geht hervor, dass von ungefähr 80 % der Katzen, die nach einer Primärinfektion latent infiziert bleiben, wiederum schätzungsweise 50 % der Tiere spontan reaktivieren und Virus ausscheiden [Gaskell and Povey, 1977].

Ellis provozierte durch die Verabreichung von Kortison eine FeHV-1-Reaktivierung, die bei 16 latent infizierten Katzen zum erneuten Ausscheiden von Virus führte [Ellis, 1982]. Nach Tötung der Tiere wurden neuronales Gewebe von Trigeminalganglien, Nervi maxillares, Riechlappen und Nervenendigungen, lymphatische Gewebe aus Tonsillen, Submandibularlymphknoten und der Milz sowie auch Gewebe der Ohrspeicheldrüse virologisch untersucht. Mit keiner der von Ellis eingesetzten Zellkulturtechniken konnte aus irgendeiner Probe FeHV-1 isoliert werden. Gaskell et al. konnten aus den Trigeminalganglien von nur 3 von 17 (18 %) Katzen, die latent mit einem Feldvirus infiziert waren, mittels einer „tissue fragment culture technique“ FeHV-1 anzüchten [Gaskell et al., 1985]. Diese Zahl entspricht ziemlich genau den 19 % (5 von 26 Tieren), die Nasisse et al. ebenfalls bei latent infizierten Tieren ermitteln konnten [Nasisse et al., 1992]. Bei keinem der Tiere war zum Zeitpunkt der Tötung Virus aus Rachen-/ Augentupfern nachzuweisen.

5.2.5.1 Reaktivierung von latenten FeHV-1 Infektionen

Eine latente FeHV-1 Infektion kann spontan, durch natürliche oder auch exogene Stressfaktoren reaktiviert werden und zu einer erneuten Virausscheidung führen, muss aber nicht erneut klinische Erkrankungssymptome bei den betroffenen Tieren hervorrufen [Ellis, 1981; Gaskell and Povey, 1977]. Vor allem spielen die Katzen, die zwar Virus ausscheiden, aber keine klinischen Erkrankungssymptome zeigen, eine wichtige Rolle in der Epizootologie der FeHV-1 Infektion.

Bei den natürlichen Stressfaktoren, die eine Virusreaktivierung bedingen können, sind vor allem Umgebungswechsel, Geburt und Laktation zu nennen [Gaskell and Povey, 1973, 1977]. Iatrogen herbeigeführt werden kann eine Virusreaktivierung am einfachsten durch Immunsuppression nach Verabreichung von Glukokortikoiden [Ellis, 1981; Gaskell and Povey, 1973, 1977, 1979b; Hickman et al., 1994].

Die Ausscheidung von Virus tritt nicht unmittelbar nach dem Einfluss der Stressoren auf, sondern mit einer Zeitverzögerung von ungefähr einer Woche [Gaskell and Povey, 1977]. Die Ausscheidungsperiode dauert dann ein bis zwei Wochen. Etwa die Hälfte der Virusträgartiere zeigen während der Ausscheidungsperiode leichte klinische Symptome, die meist milder sind als die der Primärinfektion. Bereits FeHV-1 infizierte Tiere sind nicht geschützt vor Reinfektionen und können erneut Virus ausscheiden. Es gibt jedoch eine Refraktärzeit von einigen Monaten nach einer Ausscheidungsperiode, während der eine erneute Virusausscheidung unwahrscheinlich ist [Gaskell and Povey, 1977].

Zur Erkennung aller latenten Träger bei Befall eines grösseren Bestandes kann die einmalige Kortisonbehandlung aller Katzen ungenügend sein. So fanden Hickmann et al. in einem Zuchtbetrieb initial 4 % aktiv FeHV-1 ausscheidende Katzen [Hickman et al., 1994]. Nach Entfernung dieser Tiere und der erneuten Gabe von Methylprednisolon wurden 21 % der verbliebenen Tiere als Virusausscheider identifiziert und aus dem Bestand entfernt. Sechs Wochen später wurde das ganze Prozedere nochmals wiederholt und von den verbliebenen Tieren schieden wiederum 12 % Virus aus.

5.2.6 Immunantwort auf die Infektion mit FeHV-1

Bei einer Herpesvirusinfektion ist die erste Abwehr vom Körper abhängig von den Makrophagen zusammen mit den Killerzellen und endogenem Interferon (= angeborene unspezifische Immunreaktion) [Nasisse, 1990]. Bei vorher sensibilisierten Katzen wurde auch eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ beschrieben [Tham and Studdert, 1987]. Katzen, die eine FeHV-1 Infektion hinter sich haben, reagieren mit sehr niedrigen Serumantikörpertitern (1:16 bis 1:32) und diese sind erstmals zwischen Tag 12 und 16 post infectionem messbar [Crandell, 1971]. Neutralisierende Serumantikörper steigen nach einer Reinfektion, bleiben dann aber mehr oder weniger konstant. Burgener und Maes konnten zeigen, dass virale Glykoproteine die Hauptantigene sind, die eine humorale Immunantwort auslösen [Burgener and Maes, 1988].

Die Immunität ist lückenhaft, da weder die natürliche Infektion noch die Impfung vor einer Reinfektion schützen kann. Die Katzen sollen 6 Monate nach der Primärinfektion wieder für eine Reinfektion empfänglich sein. Die Impfung kann zwar den Schweregrad der klinischen Symptome mildern, aber sie schützt nicht vor einer Infektion [Bittle and Rubic, 1974, 1975; Cocker et al., 1984; Johnson and Povey, 1985; Orr et al., 1980]. Orr et al. zeigten, dass die intranasale Impfung die Entwicklung einer Latenz in einigen Tieren verhindern konnte [Orr et al., 1980]. Wenn die Katzen auf natürliche oder iatrogene Weise immunsupprimiert sind, zeigen sie deutlichere Symptome bei einer FeHV-1 Infektion. Es wurde angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen dem feline Leukosevirus (FeLV) oder häufiger dem feline Immundefizienzvirus (FIV) und einer chronischen FeHV-1 Infektion besteht [Yamamoto et al., 1989]. Nasisse et al. beschrieb, dass eine lokale Kortikosteroid-Applikation einen negativen Effekt auf Verlauf und Schweregrad einer Primärinfektion am Auge hat [Nasisse et al., 1989b].

5.2.7 Nachweis von FeHV-1 Infektionen

In der Tierarztpraxis ist die Frage nach der Ätiologie einer Katzenschnupfeninfektion bei einer Einzelkatze meist von geringer Bedeutung. Wichtiger ist jedoch der Erregernachweis bei der Sanierung von Zuchtbeständen mit Katzenschnupfen und natürlich bei wissenschaftlichen Fragestellungen.

Weil die klinische Symptomatik alleine keine sicheren Rückschlüsse auf den Erreger zulässt, muss der Nachweis von FeHV-1-Infektionen mittels virologischer Methoden erfolgen.

Der klassische FeHV-1-Nachweis beruht auf der Kultivierung von Proben in der Zellkultur. Hierbei kommen ausschliesslich Zellkulturen feline Ursprungs zum Einsatz. Idealerweise sollte die Probenentnahme aus dem Oropharynx der Katze innerhalb einer Woche nach Auftreten der Symptome erfolgen. Bis zur Verimpfung auf die Zellkultur können die Tupfer bei 4 °C für höchstens einen Tag oder bei –20 °C für höchstens zwei Wochen gelagert werden. Das Virus vermehrt sich sehr gut in feline Nierenzellkulturen (CRFK-Zellen) und ruft einen typischen zytopathischen Effekt (CPE) hervor [Crandell et al., 1973].

Eine weitere Möglichkeit ist die Immunfluoreszenz. Es werden sowohl direkte als auch indirekte Techniken eingesetzt, wobei die indirekte Methode als sensitiver gilt [Nasisse, 1990]. Nasisse et al. setzten erfolgreich mono- und polyklonale, in Kaninchen erzeugte Antikörper ein, um in Tupferproben bzw. Konjunktivalgeschabseln von Katzen mit chronischen Konjunktividen FeHV-1 nachzuweisen. Jedoch wurden in der Zellkultur mehr als doppelt so viele Katzen als in der Immunfluoreszenz als positiv getestet.

Die neueste Methode zum Nachweis von einer FeHV-1-Infektion ist die Polymerasekettenreaktion PCR (Polymerase Chain Reaction). Mit ihrer Hilfe gelingt es, selbst geringe Mengen der Virus-DNA im Untersuchungsmaterial nachzuweisen. Reubel et al. wiesen nach, dass sich die von ihnen entwickelte PCR zum FeHV-1-Nachweis im Speichel, Augensekret und Weichteilgewebe von Katzen eignet [Reubel et al., 1993]. Die PCR erwies sich um 25 % sensitiver als herkömmliche Zellkulturtechniken und 100-fach sensitiver als Nachweisverfahren in Zellkulturüberständen. Auch die Untersuchungen von Sykes et al. ergaben eine vierfach höhere Sensitivität der PCR im Vergleich zu herkömmlichen Untersuchungen in Zellkultur [Sykes et al., 1997]. Vögtlin et al. entwickelten eine TaqMan-PCR zur quantitativen Bestimmung der FeHV-1 DNA [Vogtlin et al., 2002].

5.2.7.1 Nachweis von latenten Infektionen

Die in den letzten Jahren verstärkt zur Diagnostik eingesetzte PCR erleichtert gerade bei latent infizierten Katzen den Nachweis einer FeHV-1 Infektion. Die Studie von Reubel et al. zeigte deutlich die Vorteile der PCR auf: während die zellkulturellen Virusnachweise bei latent infizierten Tieren durchwegs negativ verliefen, konnte FeHV-1-Antigen mittels PCR aus dem Nervus trigeminus und dem Riechkolben bei 3 von 4, den Nasentubinalien von 2 von 4 Tieren und den Sehnerven und Hornhäuten von 2 der untersuchten Katzen nachgewiesen werden [Reubel et al., 1993]. Bei latent infizierten Katzen, die nach Kortisongabe Virus akut ausschieden, wurde das Virus in Rachentupfern gleichermassen mittels PCR und Zellkultur gefunden. Deutliche Unterschiede ergaben Untersuchungen der Nervi trigemini, der Sehnerven, der Nasentubinalien sowie der Hornhäute: in der Zellkultur wurden nur negative Ergebnisse erzielt, während mittels PCR bei allen untersuchten Tieren Virusnukleinsäure nach-

weisbar war. Bei 4 von 5 der untersuchten Tiere konnte auch in den Riechkolben FeHV-1 mittels PCR entdeckt werden, während die Zellkultur ebenfalls negativ blieb. Insgesamt bestätigen diese Funde die Neurotropie des FeHV-1.

Auch die Untersuchungen von Stiles et al. bekräftigen die Überlegenheit der PCR gegenüber der Virusisolation, selbst geringe Mengen FeHV-1-DNA bei akut und chronisch kranken Katzen, sowie inapparenten Virusträgern, nachzuweisen [Stiles et al., 1997]. Sykes et al. untersuchten die Sensitivität der PCR für die Erkennung von FeHV-1 bei geimpften und ungeimpften Katzen [Sykes et al., 1997]. Geimpfte Katzen waren zu 34,1 % positiv in der PCR und zu 8,2 % in der Zellkultur, während bei ungeimpften Tieren die Isolationshäufigkeit bei 80,6 % lag, mit Hilfe der PCR aber 96,8 % positive Proben gefunden wurden.

5.2.8 Bildung von Serumantikörpern gegen das FeHV-1

5.2.8.1 Antikörperbildung nach experimenteller Infektion

Schon früh wurde die Antikörperbildung nach experimenteller Infektion mit dem FeHV-1 untersucht. Crandell et al. wiesen im Jahre 1961 am 21. Tag post infectionem neutralisierende Serumantikörper gegen das FeHV-1 nach. Am Tag 24 post infectionem lag der Titer bei 2 von 8 Katzen bei 1:4 [Crandell et al., 1961]. Nach experimenteller Infektion konnten auch Walton und Gillespie 1970 erst 21 Tage post infectionem bei 7 von 12 Katzen Antikörpertiter zwischen 1:7 und 1:27 messen [Walton and Gillespie, 1970]. 21 Tage nach der Erstinfektion waren die rekonvaleszenten Katzen vor einer Zweitinfektion geschützt und schieden auch kein Virus aus. Aber am Tag 150 nach der Primärinfektion bestand bei einigen Tieren nur noch eine partielle Immunität und es wurden Krankheitssymptome und Virusausscheidung nach Reinfektion mit demselben Virusstamm festgestellt.

In der Studie von Gaskell und Povey von 1979 wurden bei 40 % der Katzen nach 16-21 Tagen post infectionem neutralisierende Antikörper gefunden [Gaskell and Povey, 1979a]. Zwischen dem Tag 30 und 34 stieg dieser Anteil sogar noch auf 73 % an. Jedoch blieben die Titer in allen Fällen relativ niedrig (1:4 bis 1:64).

Hoover et al. konnten bis zum 13. Tag post infectionem bei keiner der von ihnen mit dem FeHV-1 infizierten SPF-Katzen neutralisierende Serumantikörper nachweisen [Hoover et al., 1970] und auch Reubel et al. fanden erst ab dem 14. Tag post infectionem Serumantikörperspiegel [Reubel et al., 1992]. Diese erreichten ihren Höchststand nach 8 Wochen. Nasisse et al. gelang es bei 1 von 20 Katzen bereits am 10. Tag post infectionem neutralisierende Antikörper im Serum zu messen, nach 31 Tagen wiesen alle Katzen Titer auf (zwischen 1:4 und 1:16) [Nasisse et al., 1989b]. Nach 60 Tagen lag dann der mittlere Titer aller Tiere bei 1:16.

Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse aus verschiedenen Studien ist schwierig, da die Versuchsbedingungen sehr unterschiedlich waren (Infektionsstamm und -dosis, Tage an denen Antikörper bestimmt wurden usw.).

5.2.8.2 Antikörperbildung nach Impfung gegen das FeHV-1

Für die Entwicklung von Impfstoffen wurde neben den klinischen Befunden auch immer die Antikörperbildung nach der Impfung zur Beurteilung der zu testenden Impfstoffe herangezogen. Bittle und Rubic stellten in einer Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit eines subkutan applizierten Lebendimpfstoffes fest, dass 97 % der ge-

impften Katzen innerhalb von 4 Wochen signifikante Antikörpertiter aufgebaut hatten [Bittle and Rubic, 1974]. Zudem zeigten die geimpften Tiere nach experimenteller Infektion deutlich mildere Krankheitssymptome als ungeimpfte Katzen. Mit einem modifizierten Lebendimpfstoff gegen FeHV-1 und FCV (felines Calicivirus) intranasal geimpfte Katzen wiesen 21 Tage nach Impfung mittlere Neutralisationstiter von 1:44 für das FeHV-1 auf und sie waren gegen Belastungsinfektionen weitestgehend geschützt [Davis and Beckenhauer, 1976]. Auch in einer Untersuchung von Edwards et al. konnte bei allen mit einem modifizierten Lebendimpfstoff geimpften Tieren eine Serokonversion festgestellt werden [Edwards et al., 1977]. Die 7 Wochen nach Impfung untersuchten Antikörpertiter lagen im Mittel bei 1:9. Orr et al. impften Katzen mit einer intranasalen Vakzine, die attenuierte temperatursensitive feline Herpesviren und Caliciviren enthielt [Orr et al., 1980]. Bei 5 von 8 Katzen traten leichte Krankheitssymptome auf. Ab dem 20. Tag nach der Impfung konnten sie steigende Titer neutralisierender Antikörper gegen das FeHV-1 messen.

5.2.9 Therapie von FeHV-Infektionen bzw. dem Katzenschnupfen

Die Therapie eines akuten Katzenschnupfens erfordert intensive Betreuung und strenge Hygiene. Die Katzen sollten in einer sauberen, warmen und gut belüfteten Umgebung gehalten werden. Immer, auch bei primär nur viraler Beteiligung, sollten systemisch Breitspektrumantibiotika eingesetzt werden, um bakterielle Sekundärinfektionen zu verhindern [Kraft and Dürr, 2003]. Wenn Bordetellen und Chlamydien nachgewiesen werden können, werden Tetracycline gewählt [Ettinger and Feldman, 2005]. Bei FeHV-1 bedingten Läsionen der Bindehaut oder Hornhaut ist es auch empfehlenswert, die Augen lokal mit Antibiotika zu behandeln [Stiles, 2000]. Vitamin A, B und C können zur Unterstützung der Heilung vor allem bei Schleimhautulzera beitragen. Die oft mit Sekreten verklebten Augen und die Nase sollten mehrmals täglich mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt werden, wobei Verneblungsapparate besser geeignet sind als Nasentropfen. Je nach Zustand der Katzen, kann auch ein Flüssigkeitsersatz mittels Dauertropfinfusion nötig werden [Kraft and Dürr, 2003]. Für Katzen sind keine spezifischen antiviralen Medikamente zugelassen [Ettinger and Feldman, 2005]. Humanmedizinische Virostatika, werden jedoch teilweise bei Katzen verwendet. Galle empfiehlt Idoxuridine, Vidarabine oder eine Kombination von Acyclovir mit Interferon [Galle, 2004].

Bei Kätzchen mit kornealen Ulzera empfiehlt Stiles die Augen lokal mit antiviralen Medikamenten zu behandeln [Stiles, 2000]. Da diese Medikamente Virostatika sind, sollten sie mindestens 4 bis 6-mal pro Tag verabreicht werden. Dies ist für die Besitzer jedoch oft schwer durchführbar.

Es wurde auch angenommen, dass rekombinantes Interferon bei Katzen mit viralen Respirationstrakt- oder Augenerkrankungen hilft. In einer experimentellen Studie konnte jedoch der prophylaktische Einsatz von feline Interferon weder Infektion, noch Virusausscheidung und klinische Symptome in FeHV-infizierten Katzen verhindern oder reduzieren [Haid et al., 2006]. Resultate einer Studie von Maggs et al. weisen darauf hin, dass die einmal tägliche Behandlung (oral) von latent mit FeHV-1 infizierten Katzen mit 400 mg L-Lysin im Falle von Stress deutlich die Virusausscheidung verringert [Maggs et al., 2003]. Der Einsatz von Entzündungshemmern, vor allem Kortikosteroide, birgt das Risiko, die Erkrankung zu verschlimmern [Kraft and Dürr, 2003]. Falls nicht darauf verzichtet werden kann, sollten nichtsteroidale Entzün-

dungshemmer in Kombination mit antiviralen Medikamenten zum Einsatz kommen und lokal verabreicht werden.

Bei älteren Katzen mit rezidivierender FeHV-1-bedingter Konjunktivitis muss der Schweregrad, die Dauer und die Anfallshäufigkeit beurteilt werden [Kraft and Dürr, 2003]. Oft handelt es sich um eine leichtgradige Konjunktivitis, die in ein paar Tagen spontan abheilt und keine Therapie benötigt. Bei häufigen Rezidiven sollte das Auge jedoch während 2 bis 3 Wochen lokal mit antiviralen Medikamenten (vorzugsweise Trifluridine) behandelt werden. Wenn zusätzlich noch Hornhautulzera vorhanden sind, sollten lokal Antibiotika eingesetzt werden.

Beim akuten Katzenschnupfen ist die Prognose für eine Abheilung der Läsionen bei intensiver Behandlung gut, bei chronischen Veränderungen ist sie jedoch eher ungünstig [Kraft and Dürr, 2003].

5.2.10 Impfung

Heute werden vor allem zwei Arten von Vakzinen eingesetzt. Einerseits sind dies attenuierte Lebendvakzinen und andererseits inaktivierte Adjuvanzvakzinen. Beide werden systemisch angewendet, wobei es auch eine attenuierte Lebendvakzine zur intranasalen Anwendung gibt. Auch sind rekombinante Impfstämme entwickelt worden. Beide Impfungen – die attenuierte Lebendvakzine sowie auch die inaktivierte Adjuvanzvakzine – schützen die Katze effektiv gegen eine Erkrankung, jedoch nicht zuverlässig gegen eine Infektion bzw. gegen die Entwicklung einer Latenz [Orr et al., 1978; Scott, 1977].

Systemisch verabreichte Impfungen bewirken in der Regel eine gute Immunisierung der Tiere, jedoch können selten leichte Krankheitssymptome auftreten [Ettinger and Feldman, 2005]. Inaktivierte Adjuvanzvakzinen scheinen deshalb besser geeignet für FeHV-1-freie Katzenpopulationen. Intranasal angewendete attenuierte Lebendvakzinen induzieren eine bessere Wirkung, haben jedoch leichtgradige Nebenwirkungen wie Niesen und Augen- bzw. Nasenausfluss.

Junge Katzen werden üblicherweise im Alter von 8 bis 9 Wochen das erste Mal und mit 12 Wochen ein zweites Mal geimpft. Nach dieser Grundimmunisierung sollte jedes Jahr ein Booster gemacht werden, wobei die Immunität auch länger anhalten kann [Scott and Geissinger, 1999].

Tabelle 5.1: Vor- und Nachteile verschiedener kombinierter Vakzinen gegen FeHV und FCV [Gaskell and Bennett, 1996]

Impfung	Vorteile	Nachteile
Attenuierte Lebendvakzine, systemisch	Unterschiedliche Vakzinen erhältlich. Bequem zu applizieren.	Die meisten Vakzine schützen gegen die Mehrheit von FCV-Isolaten, aber nicht gleich gut gegen alle. Die Applikation muss sorgfältig erfolgen, denn wenn die Vakzine durch einen Applikationsfehler die orale oder respiratorische Schleimhaut erreicht, kann sie eine Erkrankung auslösen. Sollte nicht generalisieren, kann es aber in einigen Fällen.
Attenuierte Lebendvakzine, intranasal	Induziert einen besseren und schnelleren (2-4 Tage) Schutz, geeignet für Tierheime oder während eines Krankheitsausbruchs.	Schwieriger zu applizieren. Als Nebenwirkung können Niesen und manchmal auch andere Symptome auftreten.
Inaktivierte Adjuvanzvakzine, systemisch	Bequem zu applizieren. Sicher bei trächtigen Katzen. Brauchbar in virusfreien Beständen. Keine Reversion zu Virulenz.	Das Adjuvans kann gelegentlich eine Reaktion hervorrufen. Möglicherweise keine sehr gute Immunität.

Normalerweise wird die Impfung gegen feline Herpesviren mit anderen Komponenten (felines Calicivirus und felines Parvovirus) verabreicht. In einigen Präparaten ist auch noch ein Chlamydienimpfstoff enthalten.

Tabelle 5.2: 2005 in der Schweiz zugelassene Impfungen (Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe: www.ivi.ch)

Handelsname	Firma	Anwendung	Virus	Impfstoffart
Corifelin	Biokema	systemisch	FeHV FCV	inaktiviert inaktiviert
Eurifel	Biokema	systemisch	FeHV FCV Chlamydien	inaktiviert inaktiviert inaktiviert
Feligen CRP	Virbac	systemisch	FeHV FCV FPV	attenuiert attenuiert attenuiert
Feliniffa HCPk	Biokema	systemisch	FeHV FCV FPV	inaktiviert inaktiviert inaktiviert
Fortvax IV	Provet	systemisch	FeHV FCV FPV Chlamydien	inaktiviert inaktiviert inaktiviert inaktiviert
Fortvax PCT	Provet	systemisch	FeHV FCV FPV	inaktiviert inaktiviert inaktiviert

Handelsname	Firma	Anwendung	Virus	Impfstoffart
Nobivac Forcat	Veterinaria	systemisch	FeHV FCV FPV Chlamydien	attenuiert attenuiert attenuiert attenuiert
Quadricat Pk	Biokema	systemisch	FeHV FCV FPV Tollwut	inaktiviert inaktiviert inaktiviert inaktiviert

Impfungen induzieren nicht in jeder Katze den gleichen Virusschutz. Es gibt Faktoren, welche die Immunantwort einer Katze vermindern können. Dazu gehören kongenitale oder erworbene Immundefizienz, schlechter Gesundheitszustand, immunsuppressive Medikamente, Interferenz der maternalen Antikörper und Stress [Ettinger and Feldman, 2005]. Johnson et al. konnten jedoch nachweisen, dass eine intranasal verabreichte modifizierte Lebendvakzine und eine parenteral verabreichte inaktivierte Adjuvanzvakzine bei Katzenwelpen mit residualen maternalen Antikörpern erfolgreich eingesetzt werden können [Johnson and Povey, 1985]. Beim Challenge mit einem virulenten Herpesvirusstamm waren die Katzenwelpen ausreichend gegen eine Erkrankung geschützt, jedoch schützten die Impfungen nicht vor einer Infektion.

5.2.11 Prävention

Allgemein basiert die Prävention und Kontrolle von FeHV-1 Infektionen bzw. der Katzenschnupfenproblematik auf der Impfung und dem Management. Freilebende Katzen sollten regelmässig geimpft werden. Auch bei Hauskatzen empfiehlt es sich, eine Grundimmunisierung inklusiv einer Boosterung ein Jahr später zu machen. Vor allem wenn diese Tiere in ein Tierheim, an die Ausstellung oder in die Tierklinik müssen, sollte auch eine Boostervakzination vorgenommen werden.

In Tierheimen sollte darauf geachtet werden, dass alle Katzen einen aktuellen und vollständigen Impfpass besitzen. Bei aussergewöhnlichen Umständen oder wenn ein sehr schneller Schutz erforderlich ist, kann die intranasale Applikation gewählt werden. Jedoch sollten die Besitzer auf eventuelle Symptome nach der Impfung aufmerksam gemacht werden. Zudem sollte auf gute Hygiene geachtet werden.

In krankheitsfreien Zuchtbeständen wird empfohlen, regelmässig zu impfen, wobei inaktivierte Impfstoffe vorzuziehen sind. Falls trotzdem attenuierte Lebendvakzinen verwendet werden, sollte vorsichtig mit diesen umgegangen werden (Gefahr des Ableckens oder der Kontamination der Nase). Neuankömmlinge sollten 3 Wochen unter Quarantäne gestellt werden.

In enzootisch erkrankten Beständen wird vorgeschlagen, dass die Katzen regelmässig geimpft werden. Zudem sollten die Katzen möglichst stressfrei gehalten werden und durch Hygienemassnahmen sollte eine Reduktion der Virusausbreitung erzielt werden. Bei Zuchtkatzen kann eine Boostervakzination entweder vor der Paarung oder während der Trächtigkeit sinnvoll sein. Die Welpen einer virustragenden Mutter sollten möglichst früh abgesetzt werden und separat gehalten werden. Sobald die maternalen Antikörper auf einen nichtinterferierenden Spiegel abgesunken sind, empfiehlt Gaskell, die Welpen zu impfen und sie erst 2 Wochen nach der zweiten Impfung wieder zu den andern Tieren zu lassen [Gaskell and Bennett, 1996]. Laut der Studie von Johnson et al. können aber auch sehr junge Katzenwelpen (5-7 Wochen alt), die

noch residuale maternale Antikörper gegen FeHV-1 haben, erfolgreich geimpft werden [Johnson and Povey, 1985].

5.3 Impfstoffentwicklung mit Hilfe von BACs

Ein BAC (bacterial artificial chromosome) ist ein künstliches Chromosom, das aus dem singel-copy-Sex-Faktor des Bakteriums „*Escherichia coli*“ entwickelt wurde. Dieses künstliche Chromosom besteht aus DNA-Sequenzen oder einem ganzen Genom, die aus einer anderen Spezies (z.B. einem Virus) in ein Bakterium geklont wurden. Das BAC dient somit als Vektor.

Der Vorteil davon ist, dass man die ganze Methodik der Bakteriengenetik zur Verfügung hat. Das ganze Genom des Virus ist veränderbar und charakterisierbar. Erst danach wird mittels Transfektion wieder vermehrungsfähiges Virus hergestellt. Deshalb sind sowohl für das Virus nicht essentielle aber eben auch essentielle Gene veränderbar.

Als BAC klonierte Herpesvirus-DNA kann zur Erzeugung von Virusmutanten ausgenutzt werden. Es besteht die Möglichkeit, eine Vakzine zu entwickeln, die besser charakterisiert ist als herkömmliche Vakzinen [Yokoyama et al., 1997]. Bei rekombinanten Lebendvakzinen, bei denen gezielt ganze Genomabschnitte entfernt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit kleiner, dass sie zur Virulenz rückmutieren als dies bei den konventionellen Lebendimpfstoffen der Fall ist, weil letztere auf zufälligen Punktmutationen basieren. Für die Entwicklung einer rekombinanten Herpesvirus-Vakzine ist es wichtig, nicht-essentielle Gene zu finden, die zur Virulenz des Virus beitragen [Yokoyama et al., 1997]. Dazu gehören auch die Glykoproteine.

Glykoproteine findet man auf der Oberfläche von Herpesviren und den von ihnen infizierten Zellen. Sie sind wichtig bei der Interaktion zwischen dem Virus und dem Wirt. Viele dieser Glykoproteine sind nicht-essentiell für die Virusreplikation, aber beeinflussen die Pathogenese der Erkrankung. Bryant et al. konnten zeigen, dass die Alphaherpesviren eine Gruppe von Proteinen produzieren, die Chemokine sowohl auf der Membran also auch in der Interzellularflüssigkeit binden [Bryant et al., 2003]. Das Glykoprotein G des FeHV-1 gehört zu dieser neuen Familie von Chemokin-bindenden Proteinen mit einer hohen Affinität zu verschiedenen Chemokinen [Bryant et al., 2003; Costes et al., 2005]. Es scheint, dass das Glykoprotein G des FeHV-1 die Interaktion der Chemokine mit dem Zellrezeptor verhindert und somit auch ihre biologische Aktivität. Von der Herstellung eines Impfstoffes ohne Glykoprotein G sind zwei Vorteile zu erwarten: Einerseits soll die Virulenz des entwickelten Impfstoffes geringer sein (d.h. es wird eine gute Verträglichkeit erwartet) und andererseits soll man das potentielle Impfvirus vom Wildtyp mittels spezifischer PCR (im Glykoprotein G-Lokus) oder ELISA für Anti-Glykoprotein G Antikörper unterscheiden können.

Trapp et al. entwickelten zum Beispiel mit diesem System ein bovines Herpesvirus (BHV) ohne Glykoprotein E, ein zweites ohne Glykoprotein G und ein drittes, dem sowohl das Glykoprotein E als auch G fehlte [Trapp et al., 2003]. Diese mutierten bovinen Herpesviren wiesen ähnliche Virustiter auf wie das eigentliche BHV-1. Die Plaquegrößen in Zellkultur waren jedoch verkleinert.

Huang et al. konstruierten Mutanten vom equinen Herpesvirus-1 (EHV-1) und -4 (EHV-4) ohne Glykoprotein G [Huang et al., 2005]. Beim EHV-4 ohne Glykoprotein G war das Wachstum des Virus verlangsamt, die Plaques waren kleiner und ihre Morphologie verändert. Beim EHV-1 ohne Glykoprotein G waren diese Faktoren gleich

wie beim ursprünglichen EHV-1. Bei beiden mutierten Viren konnte in der Zellkultur ungefähr gleich viel Virus gewonnen werden. Antiseren von EHV-1 und -4 ohne Glykoprotein G neutralisierten den betreffenden Mutanten und das ursprüngliche Virus bis zur gleichen Verdünnung. Zusätzlich konnte man Antiserum der Mutanten vom Antiserum des Wildtyps mit Hilfe eines ELISA, der Anti-Glykoprotein G-Antikörper detektiert, unterscheiden.

Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für eine potentielle Impfstoffentwicklung mit Marker (fehlendes Glykoprotein G) bei Herpesviren verschiedener Spezies.

6 Teil B: Projekt

6.1 Einleitung

Das feline Herpesvirus 1 (FeHV-1) ist weltweit einer der wichtigsten Erreger von Erkrankungen der Augen und des oberen Respirationstraktes bei Katzen [Crandell, 1973; Gaskell et al., 1985]. Das FeHV-1 gehört zu der Familie der Herpesviridae und der Subfamilie Alphaherpesvirinae [Roizman, 1991]. Katzen infizieren sich meist schon im Welpenalter – noch vor der ersten Impfung. Wie andere Herpesviren hat das FeHV-1 die Fähigkeit, eine lebenslange Latenz zu etablieren, wobei das FeHV-1 periodisch reaktiviert wird. Schätzungsweise 80 % aller Katzen sind nach dem ersten Kontakt mit FeHV-1 latent infiziert. Von diesen latent infizierten Katzen scheiden wiederum ungefähr 50 % im Laufe ihres Lebens Virus aus und 29 % davon sogar ohne einen offensichtlichen Stimulus [Gaskell and Povey, 1977]. Klinische Symptome sieht man vor allem an Orten, wo viele Katzen zusammenleben (Tierheime, Katzenzuchten, Ausstellungen) [Gaskell and Bennett, 1996]. Bei einer akuten Infektion treten folgende Symptome auf: Apathie, Fieber, Niesen, Nasen- und Augenausfluss, Konjunktivitis und epitheliale Keratitis. Dabei kann es auch zu Aborten und einer hohen Mortalität von neugeborenen Kätzchen kommen [Nasisse, 1990; Nasisse et al., 1998; Nasisse and Guy, 1989; Povey, 1979].

Der Hauptmechanismus, durch den das FeHV-1 endemisch bleibt, scheint die Latenz mit anschließender Reaktivierung und Virusausscheidung zu sein. Der Erfolg dieser Virusstrategie ist an den weitverbreiteten Herpesvirusinfektionen zu sehen. Es wurde mit Hilfe von konventionellen attenuierten Lebendvakzinen oder inaktivierten Adjuvanzvakzinen versucht, die Infektion mit dem FeHV-1 zu kontrollieren [Bittle and Rubic, 1974; Davis and Beckenhauer, 1976; Edwards et al., 1977; Scott, 1977]. Der Nachteil von attenuierten Lebendvakzinen sind vorübergehende klinische Symptome bei intranasaler Anwendung und eine mögliche Virusausscheidung nach der Impfung. Konventionell attenuierte Lebendvakzinen (durch multiple Zellpassagen) beinhalten unbekannte genetische Veränderungen. Bei kleinen Mutationen (z.B. eine Punktmutation) besteht das Risiko einer Rückmutation zur Virulenz. Andererseits schützen inaktivierte Adjuvanzvakzinen etwas weniger effizient vor Krankheit im Gefolge einer FeHV-1-Infektion. Obwohl beide Vakzinen eine gewisse Wirksamkeit aufweisen, wurde bis jetzt keine Impfung entwickelt, welche die Katzen sowohl zuverlässig vor einer Infektion schützt, als auch die Virusausscheidung und die Entwicklung einer Latenz nach der Exposition der Katzen mit dem FeHV-1 verhindert [Orr et al., 1978; Scott, 1977].

Das Ziel einer Vakzine ist nicht nur, Symptome nach einer Infektion mit dem Wildtypvirus zu verhindern, sondern auch die Übertragung des Erregers innerhalb einer Spezies zu erschweren, eventuell sogar den Erreger zu eliminieren. Aufgrund der Probleme, welche bei herkömmlichen Vakzinen entstehen, bemüht man sich, rekombinante Lebendvakzinen zu entwickeln [Yokoyama et al., 1997]. Einerseits müssen Vakzinen sicher sein, was man durch die Entfernung von Virulenzgenen aus dem Virengenom erreichen möchte – andererseits müssen Vakzinen eine gute Immunantwort induzieren [Yokoyama et al., 1997]. Gene von Glykoproteinen, die für die

Vermehrung des Virus nicht essentiell sind, aber Virulenzfaktoren des Virus darstellen, sind mögliche Kandidaten für eine Entfernung aus dem Virusgenom. Das Glykoprotein G des FeHV-1 gehört zu einer neuen Familie von Chemokin-bindenden Proteinen mit einer hohen Affinität zu verschiedenen Chemokinen [Bryant et al., 2003; Costes et al., 2005]. Es scheint, dass das Glykoprotein G des FeHV-1 die Interaktion der Chemokine mit dem Zellrezeptor verhindert und somit auch ihre biologische Aktivität. Um eine rekombinante Lebendvakzine gegen das FeHV-1 zu entwickeln, scheint das Glykoprotein G geeignet für die Entfernung aus dem FeHV-1-Genom. Eine solche Markervakzine würde auch die Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Katzen ermöglichen (Detektion der Anti-Glykoprotein G-Antikörper mittels ELISA oder der Virusnachweis mittels PCR). Für die erleichterte Unterscheidung der beiden Viren in Zellkultur – Wildtyp-FeHV-1 und Impfvirus – kann bei der rekombinanten Vakzine ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) anstelle des Glykoproteins G eingesetzt werden [Chalfie et al., 1994]. In der vorliegenden Studie verwendeten wir ein rekombinantes Glykoprotein G-defizientes FeHV-1 (rFeHV Δ G), das anstelle des Glykoproteins G ein GFP exprimiert.

Normalerweise werden junge Katzen wegen der maternalen Antikörper nicht vor der 8. Lebenswoche geimpft. Eine Infektion mit dem FeHV-1 kann jedoch bei engem Kontakt zu einem virusausscheidenden Muttertier schon bei neugeborenen noch ungeimpften Kätzchen entstehen [Gaskell and Povey, 1977]. Deshalb sind viele junge Katzen schon vor der ersten Impfung mit dem FeHV-1 infiziert. Die Frage stellte sich nun, ob eine latente FeHV-1-Infektion durch Vakzinierung reaktiviert werden kann. Um die Sicherheit einer okulären Impfung mit einer rekombinanten FeHV-1-Vakzine und eine mögliche Reaktivierung des latenten Wildtypvirus zu erforschen, führten wir erste Untersuchungen mit latent FeHV-1-infizierten Katzen durch.

Das Ziel dieser Studie war, den Effekt einer okulären Vakzinierung mit einem rekombinanten Glykoprotein G-defizienten feline Herpesvirus (rFeHV Δ G), das anstelle des Glykoproteins G ein GFP exprimiert, in latent FeHV-1 infizierten Katzen zu untersuchen. Unsere Hypothese war, dass die rekombinante Vakzine gut verträglich ist und wir eine Reaktivierung des latenten FeHV-1 auslösen können.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Katzen

Für das Experiment wurden 9 spezifisch pathogenfreie (SPF) Kurzhaarkatzen (Harlan Sprague Dawley, Madison USA) im Alter von 28 Monaten aus einem Vorversuch übernommen. Die Gruppe bestand aus 2 weiblichen kastrierten Kätzinnen und 7 männlichen kastrierten Tieren. In einem Vorversuch wurden die Katzen mit dem FeHV-1-Feldisolat UT-88 infiziert [Haid et al., 2006]. Für alle Besuche bei den Katzen wurden autoklavierte Baumwolloveralls, Socken, Schuhe und Operationshauben angezogen, die Hände und Unterarme gewaschen und desinfiziert. Gefüttert wurden die Tiere mit verschiedenem handelsüblichem Katzenfutter.

6.2.2 Zellen

Es wurden CRFK-Zellen (Crandell Reese feline kidney) verwendet. Sie wurden in Zellkulturflaschen (Corning Incorporated, Corning NY USA) in einem Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) gezüchtet [Nasisse et al., 1989a]. Dazu wurde RPMI-Medium (RPMI 1640 mit L-Gluthamin, Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island, NY USA) genommen, das mit 2.5-10 % FCS (foetal calf serum, Amimed, BioConcept, Allschwil, CH) und Penicillin/Streptomycin (100U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin; Sigma Aldrich Chemie GmbH Teufenkirchen, Deutschland) und Gentamicin (0.5 mg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH), angereichert wurde. Gewaschen wurden die Zellen mit HBSS + CaCl₂ + MgCl₂ (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island, NY USA). Beim Passagieren der Zellen wurde zur Loslösung Trypsin-EDTA verwendet (Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island, NY USA).

6.2.3 Virus

Im Vorversuch (vor 8 Monaten) wurden die Katzen mit dem FeHV-1-Feldisolat UT-88 (Wildtyp), infiziert [Haid et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurden die latent infizierten Katzen dann mit einem rekombinanten Glykoprotein G-defizienten Herpesvirus (rFeHVΔgG) inokuliert, das vom FeHV-1 Wildtyp UT-88 abgeleitet wurde. Anstelle des Glykoproteins G (gG) wurde ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) als Marker exprimiert, um in der Virusisolation zwischen dem rekombinanten FeHV-1 und dem Wildtyp-FeHV-1 unterscheiden zu können. Der rFeHVΔgG wurde freundlicherweise von Dr. Kurt Tobler (Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich) zur Verfügung gestellt.

Die Vermehrung und Titration des Virus erfolgte auf Crandell-Reese feline kidney-Zellen (CRFK-Zellen) wie schon früher beschrieben [Bartholomew and Gillespie, 1968]. Der Titer vom FeHV-1 Wildtyp UT-88 betrug 10^{7,375} TCID₅₀/ml (Titration Lea Schudel, 13.9.04), derjenige vom rFeHVΔgG 10⁷ TCID₅₀/ml (Titration von Dr. Kurt Tobler, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich). Die Applikation bzw. Inokulation mit 100 µl rFeHVΔgG erfolgte bei allen Katzen in Narkose lokal im rechten Konjunktivalsack. Das linke Auge diente als Kontrollauge.

6.2.4 Interferon

Zur Herstellung von Positivkontrollen für den Western Blot wurde felines Interferon Omega 5 (Virbac AG, Glattbrugg, Schweiz) verwendet. In einem ersten Schritt wurde der lyophilisierte Anteil mit 1 ml des vom Hersteller beigefügten Lösungsmittels (= physiologische Kochsalzlösung) rekonstituiert. Dadurch wurde eine Lösung mit 5 Mio Einheiten Interferon Omega erhalten. Diese wurde dann in einem zweiten Schritt mit 0.9 % NaCl auf 500'000 Einheiten/ml weiterverdünnt und anschliessend bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

6.2.5 Klinische Untersuchung

Während dem Versuch wurden das Allgemeinbefinden (Appetit, Verhalten) sowie spezifische Symptome wie Nasenausfluss, Niesen, Atmung, Temperatur und die Lymphknoten kontrolliert (Woche 1+2: täglich, Woche 3+4: 3-mal wöchentlich).

6.2.6 Augenuntersuchung

Die Augen wurden während dem Versuch regelmässig (Woche 1+2: täglich, Woche 3+4: 3-mal wöchentlich) auf Epiphora, Konjunktivitis, Chemosis, Blepharospasmus, Neovaskularisation und Ulzera untersucht. Zur Beurteilung von eventuellen Hornhautläsionen wurde der Fluoreszein- und der Bengalrosafarbstoff verwendet.

6.2.7 Virusnachweis

6.2.7.1 Virusisolation

Für den Virusnachweis auf Zellkultur wurden Konjunktivalabstriche mittels steriler Tupfer von beiden Augen aller Katzen (Copan Abstrichbesteck, Aluminium, Rayon; Milian, Genf Schweiz) gemacht. Beide Tupfer (linkes und rechtes Auge gepoolt) wurden in ein 15 ml-Röhrchen mit 3 ml Medium (inkl. 2.5 % FCS, RPMI 1640 mit L-Gluthamin, Gibco Invitrogen Corporation, Grand Island, NY USA) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Tupfer wieder entfernt. Danach wurden die Röhrchen zentrifugiert (130 RCF, 10 min), damit sich allfällige Zellbestandteile oder sonstige Verschmutzungen zu einem Zellpellet separieren.

Bei den am Vortag mit ca. 500'000 Zellen beimpften 25 cm²-Zellkulturflaschen wurde das Medium (inkl. 2.5 % FCS) abpipettiert und der Zellrasen mit HBSS gewaschen. Von jeder Probe (in den 15 ml-Röhrchen) wurde nun 1 ml vom Überstand nach der Zentrifugation in eine Flasche pipettiert. Nach mindestens 1-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurden 4 ml Medium (inkl. 2.5 % FCS) dazugegeben. Eine Negativkontrolle ohne Tupferprobe wurde jeweils mitgeführt. Die Zellkulturflaschen wurden im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) gelagert und täglich auf einen zytopathischen Effekt (CPE = cytopathic effect) kontrolliert.

Nach 5 Tagen wurde eine Endbeurteilung der Zellkulturflaschen gemacht und anschliessend die Zellkulturüberstände in 15 ml Röhrchen pipettiert, zentrifugiert (130 RCF, 10 min) und 2 ml von den Proben, bei denen eine CPE-Läsion sichtbar war, bei -80°C eingefroren. Von jenen Proben, bei denen keine CPE-Läsion nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich eine Blindpassage angesetzt. Das Vor-

gehen dabei war dasselbe, d.h. es wurden wiederum 25 cm²-Zellkulturflaschen mit dem Überstand der Zellrasen ohne CPE-Läsionen beimpft.

Um die Fluoreszenz der CPE-Läsionen in der Zellkultur (rFeHVΔgG, das anstelle des Glykoproteins G ein GFP exprimiert) zu beurteilen, wurde ein Auflichtfluoreszenzmikroskop (Axiovert S 100, Carl Zeiss AG, Feldbach Schweiz) mit einem spezifischen Filtersatz für GFP verwendet. Die digitalen Bilder der Zellkultur wurden mit der Hamamatsu color chilled 3CCD Kamera (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee Deutschland) gemacht.

6.2.7.2 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung der Tränenflüssigkeit der Katzen für die DNA-Extraktion wurden Schirmer-Tränentest-(STT)-Streifchen (Essex Pharma GmbH, München Deutschland) verwendet. Unter Benutzung von Einmal-Handschuhen wurden jeder Katze jeweils in den rechten und linken unteren Bindehautsack je ein STT-Streifchen eingehängt und solange dort belassen bis die Tränenflüssigkeit mindestens die 5 mm-Marke erreicht hatte. Anschliessend wurde der von den Handschuhen eventuell kontaminierte Teil des Streifens mit einer vor jedem Gebrauch desinfizierten Schere abgeschnitten. Die STT-Streifchen mit der Tränenflüssigkeit wurden (linkes und rechtes Auge einzeln) in sterile Eppendorfröhrchen gegeben. Diese Proben wurden danach entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

Bei der DNA-Extraktion der STT-Streifchen wurde das DNeasy® Tissue Kit (Quiagen AG, Basel Schweiz), das alle notwendigen Reagenzien enthält, verwendet und es wurde wie folgt vorgegangen: Die STT-Streifchen wurden alle bei 5 mm abgeschnitten (das Besteck wurde nach jeder Probe mit DNA-Ex und Alkohol gereinigt). Dazu wurden 22 µl Proteinase (Quiagen® Proteinase K, Basel Schweiz) und 220 µl ATL-Puffer gegeben. Als Pipettierkontrolle wurde immer ein Röhrchen mit 20 µl PBS und 220 µl ATL mitgeführt. Gemischt wurde jeweils durch kurzes Vortexen. Es folgte eine Inkubation bei 56 °C während 1 Stunde. Nach kurzer Zentrifugation wurde pro Probe 220 µl AL-Puffer dazugeben die Röhrchen zwecks Denaturierung der Proteine bei 70 °C während 10 min inkubiert. Wiederum wurde kurz zentrifugiert und den Proben 220 µl Ethanol zugegeben. Darauf wurde die gesamte Flüssigkeit pro Röhrchen mit einer Pipette aufgenommen und auf die DNeasy-Membran der „Säule“ gegeben, welche zuvor in ein Collection Tube gesteckt wurde. Es folgte eine Zentrifugation während 1 Minute bei 6000 RCF und die Säulen mit der DNA auf der DNeasy-Membran wurden in das zweite Collection-Tube gegeben (der Rest wurde weggeworfen). Darauf wurden die Proben mit 500 µl vom AW1-Puffer gewaschen, wiederum während 1 Minute bei 6000 RCF zentrifugiert und in das dritte Collection-Tube gegeben (der Rest wurde weggeworfen). Es folgte ein zweiter Waschgang mit 500 µl AW2-Puffer und eine Zentrifugation während 3 Minuten bei 20'000 RCF. Die Säulen mit der DNA auf den Membranen wurden in das vierte Collection-Tube gesteckt (der Rest wurde weggeworfen) und bei 20'000 RCF 1 Minute lang trocken zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Säulen auf Eppendorfröhrchen gesteckt und mit 100 µl Elution-Puffer die DNA wieder aus der Membran gelöst. Durch eine weitere Zentrifugation während 1 Minute bei 6000 RCF, wurde die DNA-Extraktion beendet. Die Säule konnte weggeworfen werden und die extrahierte DNA der Proben wurden bei -20 °C tiefgefroren.

6.2.7.3 PCR

Die Real-Time TaqMan-PCR zum Nachweis von FeHV-1 DNA wurde von Dr. Enikő Gönczi (Veterinärmedizinisches Labor, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich) analog zu Vögtlin et al. durchgeführt [Vogtlin et al., 2002]. Die DNA-Amplifikation erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Rotkreuz Schweiz). Dafür wurden 25 µl der Reaktionsmischung verwendet, die aus 12.5 µl Mastermix (Eurogentec, Sereing, Belgien), 0.5 µl (400 nM) von beiden Primern, 0.2 µl (80 nM) der Sonde, 6.3 µl steriles H₂O und 5 µl der extrahierten DNA enthielt. Die Amplifikation wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min bei 50 °C und 10 min bei 95 °C, danach folgten 45 Zyklen mit abwechselnd 95 °C während 15 s für die Denaturierung und 60 °C während 1 min für die Andockung der Primer und deren Elongation. Die Daten wurde darauf mit der sequence detector software (Version 1.9) ausgewertet. Wenn die Intensität der Fluoreszenz 10-fach höher war als die Standardabweichung der Grundfluoreszenz (threshold cycle = CT), wurde die Probe als positiv betrachtet. Der CT-Wert ist definiert als jener Zyklus, bei dem die PCR-Amplifikation der Probe das erste Mal nachweisbar ist.

Weiter wurde auch ein Teil der PCR-Proben zur Unterscheidung der beiden FeHV-1 – Wildtyp und rFeHVΔgG – von Dr. Kurt Tobler (Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich) verarbeitet [Reubel et al., 1993; Vogtlin et al., 2002]. In die Röhrchen des PuRe Taq Ready-To-Go PCR beads-Kit (Amersham Biosciences, Dübendorf Schweiz) wurde je 2 µl der beiden Primer, 10 µl der Proben-DNA und 11 µl steriles H₂O hinzupipettiert. Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe der DNA Engine PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research/ BioConcept, Allschwil Schweiz) und wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2 min bei 95 °C, danach folgten 35 Zyklen (Denaturierung, Andockung und Elongation) mit abwechselnd 30 s bei 95 °C, 30 s bei 54 °C und 30 s bei 72 °C. Die PCR-Proben (10 µl der Probe und 2 µl Loading buffer) wurden auf einem 2 % Agarosegel (3 g Sea Kem Agarose, 150 ml 1x TAE buffer, 15 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde während 45 min bei 50 V laufen gelassen.

6.2.8 Virustitration

Die Virustitration diente zur Bestimmung der TCID₅₀/ml (tissue culture infective dose) der beiden FeHV-1 (Wildtyp und rFeHVΔgG) [Bartholomew and Gillespie, 1968]. Dazu wurde eine 96-Deep-Well-Platte (NuncTM Surface, milian, Genf Schweiz) mit 10'000 CRFK-Zellen pro Well beimpft und während 24 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Danach wurde vom Virus eine 10er-Verdünnungsreihe (von 1 bis 1⁻⁹) in Medium (inkl. 2.5 % FCS) hergestellt. Pro Verdünnung wurden 8 Wells mit je 100 µl beimpft und zusätzlich wurde in 16 Vertiefungen als Zellkontrolle nur Medium (inkl. 2.5 % FCS) gegeben. Nach 4 und 5 Tagen wurden diese Platten dann unter dem Binokularmikroskop auf CPE-Läsionen untersucht. Die genaue TCID₅₀/ml wurde anhand der Methode nach Spearman und Kaerber berechnet [Kaerber, 1931; Mayr et al., 1974].

6.2.9 Blutentnahme

Die Katzen wurden für die Blutentnahme mit einem Gemisch aus 5 ml Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Dr. E. Gräub, Bern Schweiz), 0.42 ml Azepromazin (Prequillan®, FATRO S.p.A. Ozzanon Emilia, Italien), 0.8 ml Butorphanol (Morphasol®, Dr. E. Gräub, Bern Schweiz), 0.42 ml Midazolam (Dormicum®, Roche Pharma, Reinach Schweiz) und 1.25 ml Ketamin (Narketan® 10 %, Vetoquinol AG, Belp Schweiz) narkotisiert. Davon wurde jeweils 0.7 bis 0.9 Einheiten einer Insulinspritze (Becton, Dickinson and Company, Basel Schweiz) intramuskulär gespritzt. Das Blut wurde in Rückenlage mittels Vakutainer-Röhrchen aus der Vena jugularis entnommen. Je nach Bedarf wurde die Narkose mit Atipamezol (Antisedan®, Pfizer, Dr. E. Gräub, Bern Schweiz) antagonisiert.

Die Katzen wurden so lange beaufsichtigt bis sie wieder aus der Narkose erwacht waren.

6.2.10 Mx-Nachweis mittels Western Blot

Für den Nachweis von endogen produziertem Interferon wurde das Mx-Protein in den Blutleukozyten untersucht. Als dafür geeignete Methode hat sich der Western Blot herausgestellt [Muller-Doblies et al., 2002].

Das Blut wurde mit EDTA-beschichteten Vakutainer-Röhrchen entnommen (Becton, Dickinson and Company, Basel Schweiz) und danach sofort verarbeitet.

Zuerst mussten die Leukozyten durch Ammonium-Chlorid-Lyse von unkoagulierte Blut isoliert werden. Dazu wurden 5 ml der EDTA-Blutproben in 40 ml Lysispuffer (150 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 M EDTA) in einem 50 ml-Röhrchen lysiert (Inkubation: 10 min bei Raumtemperatur). Das Gemisch wurde danach zentrifugiert (200 RCF, 10 min) und der Überstand abgegossen. Das entstandene Zellpellet wurde mit HBSS wieder gelöst, das Gemisch in Eppendorfröhrchen gegeben und zentrifugiert (850 RCF, 5 min). Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde jeweils abpipettiert. Dieser gesamte Waschvorgang wurde 2-mal durchgeführt. Das gereinigte Zellpellet wurde in 200 μl Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid Gelelektrophoresepuffer (250 mM Tris HCl [pH 6.8], 5 % SDS, 10 % β -mercaptoethanol, 40 % Glycerol, 0.03 % Bromphenolblau) gelöst, kurz gevortext, 10 min bei 96 °C erhitzt und nochmals durch Vortexen gemischt. Die so für den Western Blot vorbereiteten Proben wurden entweder bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Zur Proteinauftrennung der Proben wurde eine Gelelektrophorese auf einem 10 % SDS Polyacrylamid Gel in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 1 % SDS; pH 8.3) durchgeführt. Sie wurde zuerst während 10 min bei 50 Volt und als zweites ca. 50 min bei 200 Volt laufen gelassen (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Schweiz). Pro Probe wurden 15 μl in die Gelslots geladen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine in einem Sandwich vom Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell, Riehen, Schweiz) übertragen. Der Blot wurde unter gekühlten Bedingungen im Blotting Buffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) laufen gelassen: 1 h bei 100 V. Zur Kontrolle wurden die Membranen mit Ponceau-Rot angefärbt und die Färbung mit PBS wieder gewaschen. Die Blots wurden jeweils über Nacht bei 4 °C in High-Salt Tris Buffer (HTBST; 50 mM Tris HCl [pH 7.0], 500 mM NaCl, 0.2 % Tween 20) mit 5 % Trockenmagermilch geblockt. Am folgenden Morgen wurden die Blots während 3 x 5 min mit HTBST gewaschen. Da-

nach folgte die Inkubation mit dem monoklonalen murinen Anti-Mx-Antikörper, MAb 143 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Metzler und Jovan Pavlovic, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich), für eine Stunde bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:5). Dieser Antikörper entstammt aus einem Hybridoma Zellkulturüberstand und reagiert mit Mx-Proteinen vieler verschiedener Spezies (Jovan Pavlovic, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, nicht publizierte Daten).

Der Blot wurde wiederum 3 x 5 min mit HTBST gewaschen. Weiter folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-markierten Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin G (A 9044, Sigma, Saint Louis, Missouri USA; Verdünnung 1:50000) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem die Blots nochmals 3 x 5 min mit HTBST gewaschen wurden, kam ein zusätzlicher Waschgang mit Aqua dest. während 5 min hinzu. Die Entwicklung der Blots (1 min) erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence Verfahren (Amersham Pharmacia, Biotech, Dübendorf Schweiz). Während 1 bis 25 min wurden Röntgenfilme (Roche Pharma AG, Rotkreuz Schweiz) mit diesen Blots in einer Röntgenkassette belichtet und die Filme darauf entwickelt.

Auf jedem Gel wurden sowohl die Proben als auch ein Marker (Prestained SDS-PAGE Standards Low Range; Bio-Rad Laboratories AG, Rheinach Schweiz) und eine positive und negative Kontrolle appliziert. Die Kontrollen wurden folgendermassen in Zellkultur hergestellt. CRFK-Zellen wurden während 24 h mit 10'000 U/ml Medium (inkl. 0 % FCS) Interferon Omega 5 (Virbag AG, 8152 Glattbrugg) inkubiert und danach mit Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche gelöst. Nach der Zentrifugation (130 RCF, 10 min) und dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresepuffer wieder gelöst (ca. 1 Mio Zellen pro 100 µl SDS-Polyacrylamid Puffer). Da die Positivkontrolle im Western Blot zu stark war, wurde sie nochmals im Verhältnis 1:3 mit SDS-Polyacrylamid Puffer verdünnt. Für die Negativkontrolle wurde gleichermassen vorgegangen, jedoch wurden die CRFK-Zellen nicht mit Interferon behandelt.

Die Auswertung der Röntgenfilme erfolgte semiquantitativ und wurde immer von der gleichen Person durchgeführt. Die Intensität der Bandenschwärzung wurde mit der Bande der Positivkontrolle verglichen und auf einer Skala mit 0 bis 3 bewertet (die Positivprobe entsprach 3).

6.2.11 Antikörperrnachweis mittels Serumneutralisationstest

Für den Antikörperrnachweis im Blut wurde in dieser Studie der Serumneutralisationstest (SNT) verwendet. Der SNT stellt die historisch älteste und immer noch eindeutigste Methode zur Überprüfung der Immunität dar. Das Prinzip besteht in der Bildung eines Virus-Antikörper-Komplexes nach erfolgter Bindung homologer Antikörper mit aussenliegenden Epitopen des Virions. Hierdurch werden die Aussenstrukturen, mit deren Hilfe sich das Virus an die Wirtszellmembran bindet, sterisch blockiert. Als Folge kommt es zum Verlust der Infektiosität, der sogenannten Virusneutralisation.

Im Versuch wurden Vakutainerröhrchen ohne Inhalt (Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) zur Serumgewinnung verwendet. Die Probenröhrchen wurden, um die geronnenen Blutbestandteile vom Serum zu trennen, zuerst zentrifugiert (4000 RCF, 10 min) und anschliessend wurden 2 ml vom überständigen Serum in ein Kryoröhrchen (Techno Plastic Product AG, Trasadingen Schweiz) abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

Am ersten Tag wurden 96-Deep-Well-Platten pro Well mit ca. 20'000 CRFK-Zellen in 50 µl RPMI-Medium gelöst (inkl. 10 % FCS) beimpft und während 24 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂).

Für den Test wurden 45 µl Serum in 405 µl Medium (inkl. 0 % FCS) verdünnt (1:10). Davon wurden in sterilen 96-Deep-Well-Platten (milian, CH-1228 Plan-les Ouates/Geneva), die pro Well 1.2 ml fassten, 2er-Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:1240 hergestellt. Dazu wurde wiederum RPMI-Medium (inkl. 0 % FCS) verwendet. Zu den Serumverdünnungen (pro Verdünnung 200 µl) wurde die gleiche Menge (200 µl) vom FeHV-1 (Wildtyp, verdünnt auf 1000 TCID₅₀/ml) dazu gegeben. Das Gemisch wurde mindestens 1 h lang inkubiert (37 °C, 5 % CO₂), damit die neutralisierenden Antikörper an das Virus binden konnten.

Danach wurde das Serum-Virus-Gemisch auf die Zellen in den vorbereiteten 96-Depp-Well-Platten (NuncTM Surface, milian, Genf Schweiz) gegeben. Pro Serumverdünnung wurden jeweils 4 Wells verwendet. Es folgte wiederum eine Inkubation (37 °C, 5 % CO₂). Die Platten wurden nach 3 und 5 Tagen beurteilt, ob ein CPE (cytopathic effect) entstanden ist oder nicht. Die Serum-Antikörper-Titer wurden in dem Bereich bestimmt, wo 50 % der Wells keinen CPE und 50 % einen CPE zeigten. Daneben wurde bei jedem neu angesetzten Serumneutralisationstest ebenfalls eine Virusrücktitration durchgeführt, damit die Virusverdünnung überprüft werden konnte (1000 TCID₅₀/ml). Ebenfalls mitgeführt wurde jeweils eine Negativkontrolle (Zellen mit nur Medium) [Bartholomew and Gillespie, 1968; Povey and Johnson, 1969].

6.2.12 Versuchsplan

Die Probenentnahmen wurden nach folgendem Zeitplan (Tabelle 6.1) durchgeführt. Am Tag 0 wurden zur Ermittlung des Ausgangszustandes von allen Katzen „Leer“-Proben erhoben. Danach erfolgte ebenfalls noch am Tag 0 die Inokulation mit dem rFeHVΔgG. Allen 9 Katzen wurde unter Narkose je 100 µl Virus (Titer: 10⁷ TCID₅₀/ml) in den rechten Konjunktivalsack geträufelt.

Tabelle 6.1: Versuchsplan

Tage post inoculationem	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	16	19	21	23	28	35	42	57	72	86	100	114
Inokulation: rFeHV delta gG	x																										
Klinische Untersuchung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
Augenuntersuchung	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
Blutentnahme (Mx-Nachw.)	x	x						x							x			x		x	x	x	x	x	x	x	x
Blutentnahme (AK-Nachw.)	x							x							x			x		x		x	x	x	x	x	x
Tupfer (Virusisolation)	x	x			x			x				x			x			x	x								
STT (Virusnachweis: PCR)	x	x			x			x				x			x			x	x								x

Die Probenentnahmen für den Virusnachweis sowie die klinische und die Augenuntersuchung wurden nach 4 Wochen nicht mehr durchgeführt, nachdem der Virusnachweis während 2 Wochen negativ blieb und die Katzen keine Symptome mehr zeigten. Die Blutproben für den Antikörper- und Mx-Nachweis wurden während insgesamt 16 Wochen entnommen.

6.3 Resultate

6.3.1 Klinische Symptome

Der Allgemeinzustand der Katzen war während dem ganzen Versuch unauffällig. Ihr Verhalten hat sich nicht verändert und sie haben auch stets gut gefressen. Vorübergehend konnte man leicht vergrößerte Mandibularlymphknoten feststellen, sonst zeigten sie jedoch keine klinischen Symptome (Nasenausfluss, Niesen, erschwerte Atmung oder erhöhte Temperatur).

6.3.2 Augensymptome

Am Tag 0 vor Versuchsstart wurden die Augen der Katzen genau untersucht. Dazu wurde eine Spaltlampe verwendet. Bei den meisten Katzen waren zarte stromale Fibrosen und ghost vessels (blutleere Gefässschläuche) als Residuen aus der Primärfektion mit FeHV-1 (Wildtyp) zu erkennen [Haid et al., 2006]. Zudem waren die beiden ventralen Tränenpunkte der Katze 6 „Pete“ vernarbt und daher nicht mehr durchgängig.

Nach der Inokulation des rFeHV Δ gG konnten höchstens geringgradige Symptome an den Augen festgestellt werden. Bei Katze 1 „Diego“, Katze 4 „Paolo“, Katze 8 „Soto“ und Katze 9 „Matilde“ konnte vorübergehend eine leichtgradige Epiphora nachgewiesen werden (feuchter Lidrand). Bei Katze 6 „Pete“ war die Epiphora nicht beurteilbar, da aufgrund der verschlossenen Tränenpunkte die Tränenflüssigkeit ohnehin nach aussen abließ und eine Tränenstrasse bildete. Der Schirmer-Tränen-Test wurde nicht durchgeführt (erniedrigte Tränenproduktion der Katzen in Narkose, Abwehrverhalten im Wachzustand). Bei 8 Katzen wurde zeitweise auch eine leichtgradige Hyperämie der Bindehaut gesehen (Ausnahme Katze 9 „Matilde“). Sowohl Chemosis als auch Blepharospasmus wurden nie gesehen.

Aufgrund fehlenden Auftretens von Hornhautveränderungen wurde auf den Fluoreszein- und den Bengalrosa-Farbstofftest verzichtet.

6.3.3 Verlauf der Virusausscheidung

Der Virusnachweis mittels Virusisolation und TaqMan-PCR wurde am Tag 0, 1, 4, 7, 11, 14, 18 und 21 post inoculationem durchgeführt. Für die Virusisolation wurden die Proben von beiden Augen einer Katze jeweils zusammen auf eine Zellkultur gegeben. Bei der PCR wurden das linke und das rechte Auge einzeln ausgewertet.

6.3.3.1 Ergebnisse der Virusisolation

Am Tag 1 post inoculationem konnte bei 4 Katzen (Katzen 3 „Tigi“, 5 „Casandra“, 7 „Greebo“ und 8 „Soto“) anhand der CPE-Läsionen auf der Zellkultur Virus nachgewiesen werden. Katze 8 „Soto“ war zusätzlich am Tag 4 nach der Infektion positiv. Da beim rFeHV Δ gG aufgrund des exprimierten Markers (GFP = green fluorescent protein) in Zellkultur CPE-Läsionen mit Fluoreszenz zu erwarten waren, wurden alle positiven Proben – bzw. die Zellkulturen mit CPE-Läsionen – auch unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut. Dabei war in allen Bereichen mit CPE eine grüne Fluo-

reszenz sichtbar (Abbildung 6.1 und 6.2). Das heisst, es handelte sich um das rFeHV Δ gG. Eine Ausnahme bildete die Probe von Katze 5 „Casandra“ vom Tag 1 nach der Infektion, bei welcher sowohl CPE-Läsionen mit Fluoreszenz (rFeHV Δ gG) als auch CPE-Läsionen ohne Fluoreszenz zu sehen waren.

Bei allen positiven Proben der Virusisolation, konnte man auf der Zellkultur nur vereinzelte kleine Bereiche finden, die CPE zeigten.

Von den Zellkulturüberständen der 5 positiven Proben der Virusisolation wurde zur Unterscheidung der beiden FeHV-1 – Wildtyp und rFeHV Δ gG – nochmals eine spezifische konventionelle PCR durchgeführt (Dr. Kurt Tobler, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich). Dabei konnte bei allen Proben nur das rFeHV Δ gG nachgewiesen werden (Abbildung 6.3). Auch bei Katze 5 „Casandra“ am Tag 1 konnte trotz CPE-Läsionen ohne Fluoreszenz keine FeHV-1 DNA vom Wildtyp gefunden werden. Eine Ausnahme bildete die Probe vom Tag 4 von Katze 8 „Soto“, die in der Zellkultur CPE zeigte, bei der aber in der PCR weder rFeHV Δ gG noch Wildtyp-FeHV-1 nachgewiesen werden konnte.

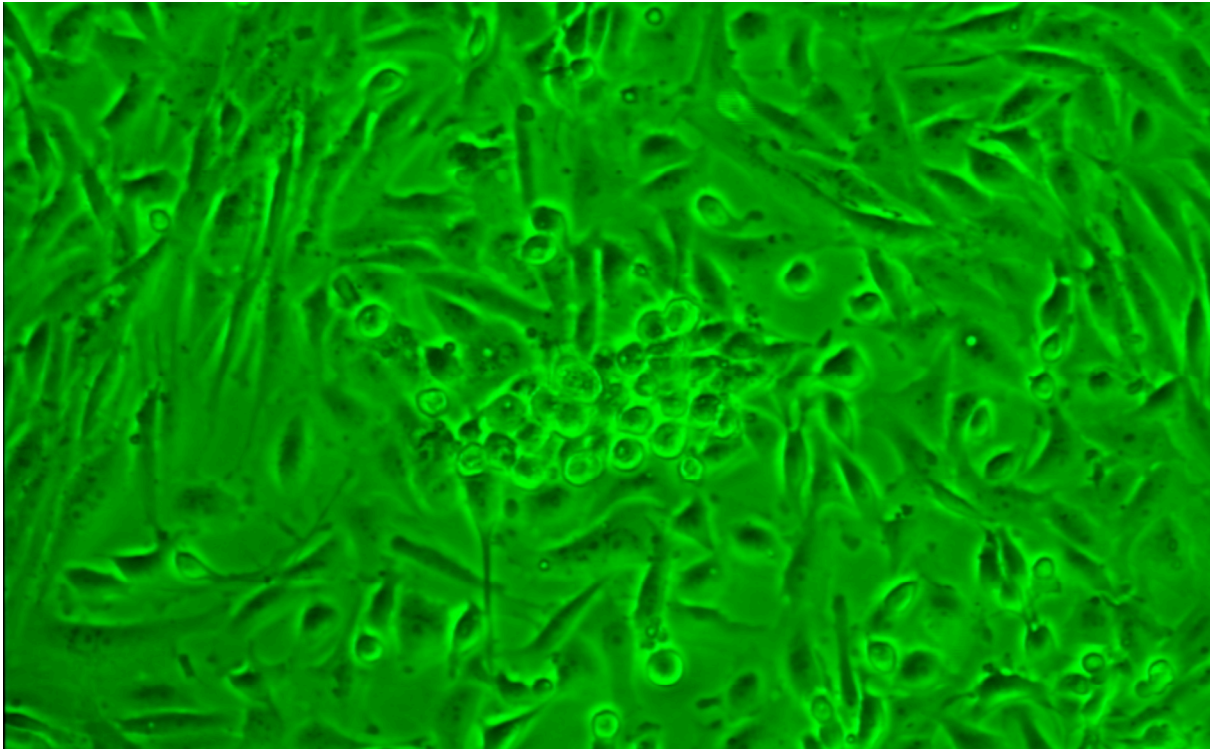


Abbildung 6.1: CPE 1 (Katze 3 „Tigi“, Tag 1, Grünlichtaufnahme)

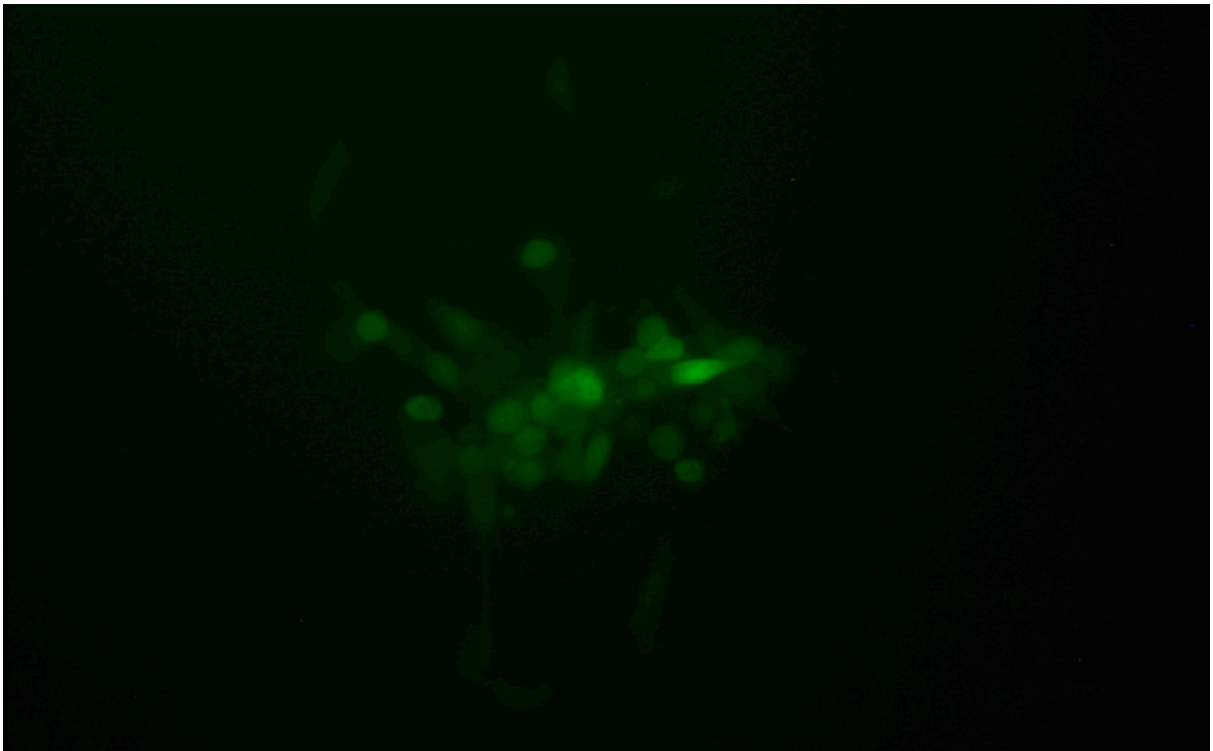


Abbildung 6.2: CPE 1 (Katze 3 „Tigi“, Tag 1, UV-Licht-Aufnahme)

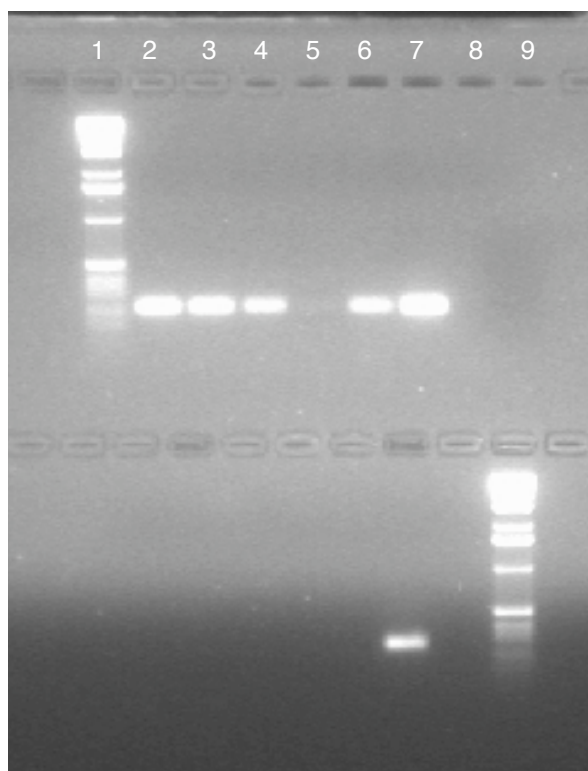


Abbildung 6.3: PCR von den Zellkulturüberständen der positiven Proben: oben beide FeHV-1 (Wildtyp und rFeHVΔgG, Sonde für gE), unten nur Wildtypvirus (Sonde für gG)

Position (von links nach rechts)	Zellkulturüberstand	Resultat Virusisolation (F = Fluoreszenz)
1	Marker (oberes Gel)	-
2	Katze 3 "Tigi": Tag 1	CPE (F)
3	Katze 5 "Casandra": Tag 1	CPE (F+ohne F)
4	Katze 7 "Greebo": Tag 1	CPE (F)
5	Katze 8 "Soto": Tag 4	CPE (F)
6	Katze 8 "Soto": Tag 1	CPE (F)
7	Positivkontrolle (Virus)	-
8	Negativkontrolle (Wasser)	-
9	Marker (unteres Gel)	-

6.3.3.2 Ergebnisse der TaqMan-PCR

Bei der TaqMan-PCR konnte am Tag 1 post inoculationem bei allen Katzen im rechten Auge (Ort der Infektion bzw. Vakzination) Virus nachgewiesen werden (CT-Werte von 20.28 bis 31.73). Am Tag 4 waren noch Katze 1 „Tigi“, Katze 4 „Paolo“, Katze 5 „Casandra“, Katze 6 „Pete“, Katze 7 „Greebo“ und Katze 8 „Soto“ positiv. An den folgenden untersuchten Tagen (7, 11, 14, 18, 21) stellte man bei allen Katzen keine Virusausscheidung mehr fest (Tabelle 6.2 und Diagramm 6.1).

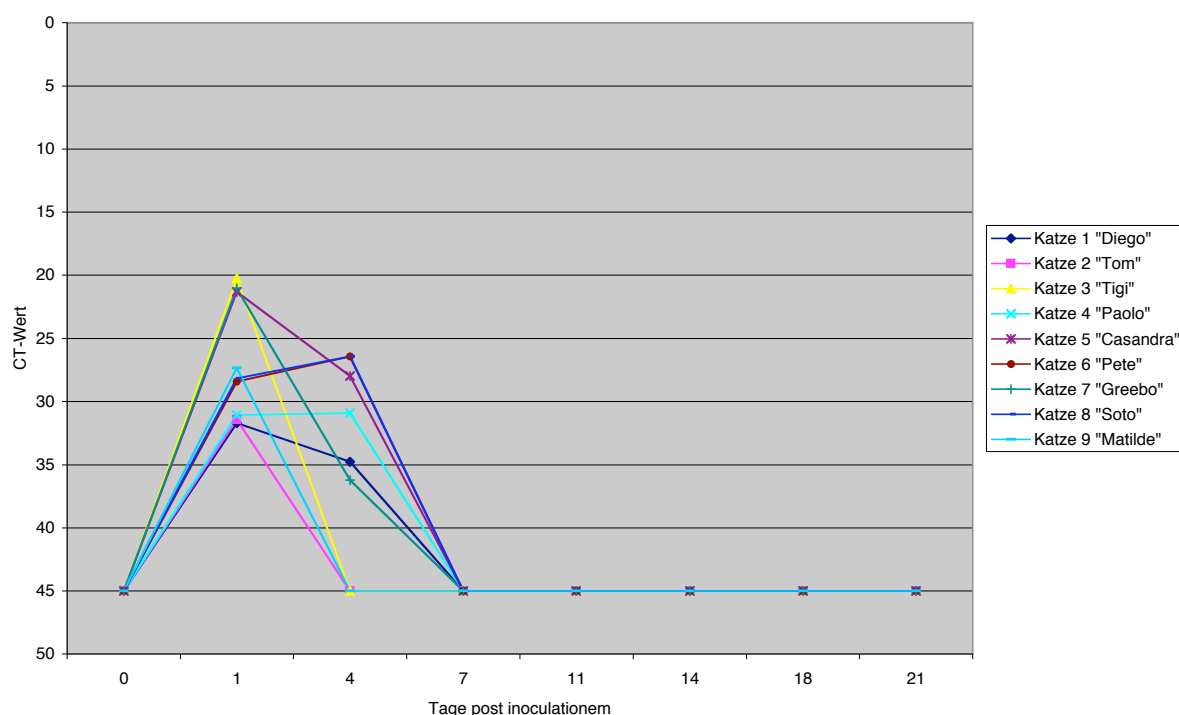
Im linken Auge konnte nur am Tag 0 bei zwei Katzen (Katzen 2 „Tom“ und 4 „Paolo“) einen minimal erniedrigten CT-Wert (44.45 und 37.09) in der TaqMan-PCR nachgewiesen werden. Man stellte jedoch mittels konventioneller spezifischer PCR fest, dass es sich um das rFeHVΔgG handelte, was für eine Kontamination bei der Pro-

benennung spricht. Es konnte also in den linken Augen während dem Versuch niemals Virus nachgewiesen werden.

Tabelle 6.2: CT-Werte rechtes Auge (TaqMan-PCR)

Tage post inoculationem	0	1	4	7	11	14	18	21
Katze 1 "Diego"	45	31.7	34.75	45	45	45	45	45
Katze 2 "Tom"	45	31.42	45	45	45	45	45	45
Katze 3 "Tigi"	45	20.28	45	45	45	45	45	45
Katze 4 "Paolo"	45	31.08	30.93	45	45	45	45	45
Katze 5 "Casandra"	45	21.32	27.99	45	45	45	45	45
Katze 6 "Pete"	45	28.41	26.44	45	45	45	45	45
Katze 7 "Greebo"	45	21.03	36.22	45	45	45	45	45
Katze 8 "Soto"	45	28.17	26.44	45	45	45	45	45
Katze 9 "Matilde"	45	27.35	45	45	45	45	45	45

Diagramm 6.1: CT-Werte (TaqMan-PCR)



Von allen positiven TaqMan-PCR-Proben wurde zur Unterscheidung der beiden FeHV-1 – Wildtyp und rFeHVΔgG – nochmals eine spezifische konventionelle PCR durchgeführt (Dr. Kurt Tobler, Virologisches Institut, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei allen positiven TaqMan-PCR-Proben, um das rFeHVΔgG handelte (Abbildung 6.4).

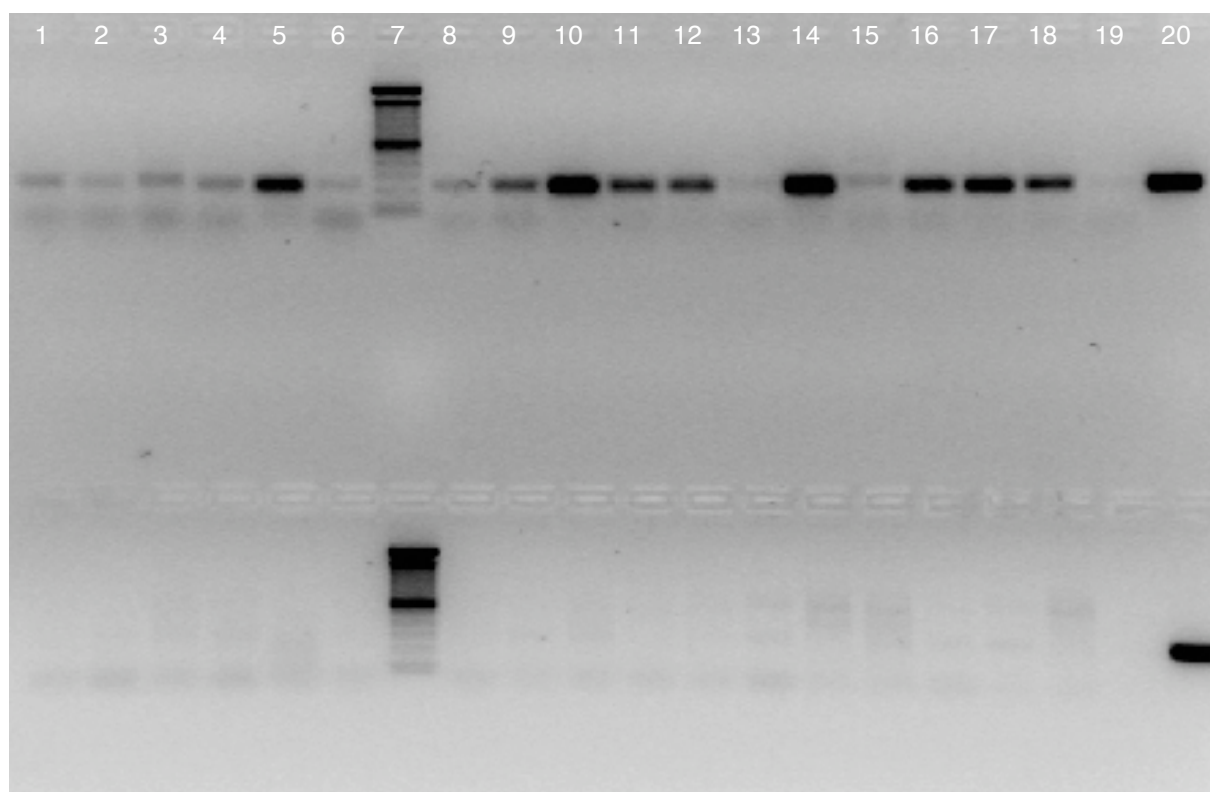


Abbildung 6.4: PCR aller im TaqMan positiven Proben: oben beide FeHV-1 (Wildtyp und rFeHVΔgG, Sonde für gE), unten nur Wildtypvirus (Sonde für gG)

Position (von links nach rechts)	Probe	TaqMan-Resultat
1	Katze 1 "Diego": Tag 1	31.73
2	Katze 1 "Diego": Tag 4	34.75
3	Katze 2 "Tom": Tag 0	44.45
4	Katze 2 "Tom": Tag 1	31.42
5	Katze 3 "Tigi": Tag 1	20.28
6	Katze 4 "Paolo": Tag 0	37.09
7	Marker	-
8	Katze 4 "Paolo": Tag 1	31.08
9	Katze 4 "Paolo": Tag 4	30.93
10	Katze 5 "Casandra": Tag 1	21.32
11	Katze 5 "Casandra": Tag 4	27.99
12	Katze 6 "Pete": Tag 1	28.41
13	Katze 6 "Pete": Tag 4	26.44
14	Katze 7 "Greebo": Tag 1	21.03
15	Katze 7 "Greebo": Tag 4	36.22
16	Katze 8 "Soto": Tag 1	28.17
17	Katze 8 "Soto": Tag 4	26.44
18	Katze 9 "Matilde": Tag 1	27.35
19	Negativkontrolle (Wasser)	-
20	Positivkontrolle (Virus)	-

Am Tag 114 post inoculationem wurden zur Kontrolle nochmals Augentupfer bei allen Katzen genommen und davon eine PCR durchgeführt. Dabei konnte bei keinem Tier Virus nachgewiesen werden.

6.3.3.3 Übersicht Virusausscheidung

Tabelle 6.3: Übersicht über die CT-Werte und die Resultate der Virusisolation (F = mit Fluoreszenz)

Tage post inoculationem	1	1	4	4	7
	CT-Wert (rechtes Auge)	Virusisolation (beide Augen)	CT-Wert (rechtes Auge)	Virusisolation (beide Augen)	
Katze 1 "Diego"	31.73	neg	34.75	neg	ab Tag 7 bis Tag 114 waren alle Proben negativ
Katze 2 "Tom"	31.42	neg	45	neg	
Katze 3 "Tigi"	20.28	CPE (F)	45	neg	
Katze 4 "Paolo"	31.08	neg	30.93	neg	
Katze 5 "Casandra"	21.32	CPE (F+ohne F)	27.99	neg	
Katze 6 "Pete"	28.41	neg	26.44	neg	
Katze 7 "Greebo"	21.03	CPE (F)	36.22	neg	
Katze 8 "Soto"	28.17	CPE (F)	26.44	CPE (F)	
Katze 9 "Matilde"	27.35	neg	45	neg	

6.3.4 Verlauf der Antikörpertiter

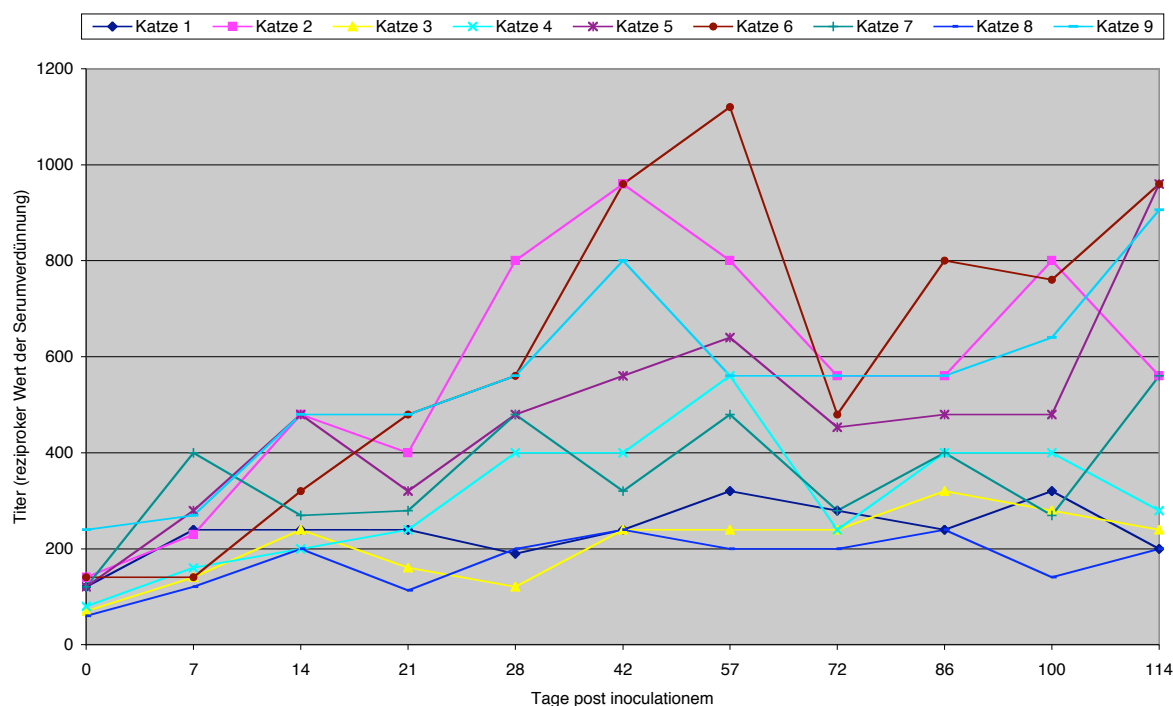
Der Antikörpertiter wurde mit dem Serumneutralisationstest ermittelt. Die Ausgangstitern der 9 Katzen lagen vor dem Versuch (Tag 0) zwischen 1:60 und 1:240. Ausser bei zwei Tieren (Katzen 1 „Diego“ und 9 „Matilde“) konnte im Verlauf des Versuchs ein signifikanter, d.h. mindestens 4-facher Anstieg des Antikörpertiters beobachtet werden. Katze 6 „Pete“ zeigte sogar einen 8-fachen Anstieg und Katze 2 „Tom“, Katze 4 „Paolo“ und Katze 5 „Casandra“ einen 7-fachen.

Bei den meisten Katzen konnte der 4-fache Anfangstiter ab Tag 28 nachgewiesen werden. Katze 5 „Casandra“ zeigte das wiederum schon ab dem 14. Tag. Eher verspätet konnte dieser Anstieg bei Katze 8 „Soto“ (Tag 42) und bei Katze 3 „Tigi“ (Tag 86) festgestellt werden. Am Tag 72 wurden bei allen Katzen wieder etwas tiefere Werte ermittelt. Bis zum Tag 114 gab es jedoch bei Katze 4 „Paolo“, Katze 5 „Casandra“, Katze 6 „Pete“ und Katze 9 „Matilde“ nochmals einen deutlichen Anstieg der Antikörpertiter im Blut (Tabelle 6.4 und Diagramm 6.2).

Tabelle 6.4: Resultate SNT: AK-Titer im Serum (markiert = min. 4-facher Titeranstieg)

Tage post inoculationem	0	7	14	21	28	42	57	72	86	100	114
Katze 1 "Diego"	1:120	1:240	1:240	1:240	1:190	1:240	1:320	1:280	1:240	1:320	1:200
Katze 2 "Tom"	1:140	1:230	1:480	1:400	1:800	1:960	1:800	1:560	1:560	1:800	1:560
Katze 3 "Tigi"	1:70	1:140	1:240	1:160	1:120	1:240	1:240	1:240	1:320	1:280	1:240
Katze 4 "Paolo"	1:80	1:160	1:200	1:240	1:400	1:400	1:560	1:240	1:400	1:400	1:280
Katze 5 "Casandra"	1:120	1:280	1:480	1:320	1:480	1:560	1:640	1:453	1:480	1:480	1:960
Katze 6 "Pete"	1:140	1:140	1:320	1:480	1:560	1:960	1:1120	1:480	1:800	1:760	1:960
Katze 7 "Greebo"	1:120	1:400	1:270	1:280	1:480	1:320	1:480	1:280	1:400	1:270	1:560
Katze 8 "Soto"	1:60	1:120	1:200	1:113	1:200	1:240	1:200	1:200	1:240	1:140	1:200
Katze 9 "Matilde"	1:240	1:270	1:480	1:480	1:560	1:800	1:560	1:560	1:560	1:640	1:905

Diagramm 6.2: Resultate SNT: AK-Titer im Serum



6.3.5 Verlauf der Mx-Ausscheidung

Bereits am Tag 1 konnte mit Ausnahme von Katze 8 „Soto“ bei allen Katzen Mx-Protein und damit indirekt eine endogene Interferonproduktion nachgewiesen werden. Am Tag 7 stellte man noch bei 7 Katzen (Ausnahme: Katzen 1 „Diego“ und 4 „Paolo“) eine Mx-Produktion fest. 8 Katzen waren von Tag 14 bis 42 wieder negativ. Auffällig war, dass Katze 2 „Tom“ während der ganzen Messperiode (Tag 1 bis 114) Mx-Protein produziert hatte. Ab Tag 57 bis 114 konnte das Mx-Protein bei allen Katzen im Blut wieder nachgewiesen werden (Ausnahmen: Tag 57 Katze 8 „Soto“; Tag 72 Katzen 6 „Pete“, 7 „Greebo“, 8 „Soto“ und 9 „Matilde“; Tag 114 Katze 5 „Casandra“) (Tabelle 6.5).

Tabelle 6.5: Mx-Nachweis im Blutmittels Western Blot (+++ entspricht der Positivkontrolle)

Tag post inoculationem	0	1	7	14	21	28	35	42	57	72	86	100	114
Katze 1 "Diego"	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Katze 2 "Tom"	-	+	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+	+	+
Katze 3 "Tigi"	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Katze 4 "Paolo"	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Katze 5 "Casandra"	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Katze 6 "Pete"	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Katze 7 "Greebo"	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Katze 8 "Soto"	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Katze 9 "Matilde"	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+++	+

6.4 Diskussion

Katzenschnupfen ist in der Praxis eine häufig gesehene Erkrankung der Katze. Die wichtigsten Erreger neben FeHV-1 sind feline Caliciviren und Chlamydien. Es handelt sich dabei um eine Erkrankung der oberen Atemwege, der Mundschleimhaut und der Augen. Katzen infizieren sich mit FeHV-1 häufig schon im Welpenalter – noch vor der ersten Impfung. In der Regel kommt es nach einer primären Infektion zur Latenz, die durch Stress ausgelöst, in eine Reaktivierung des FeHV-1 übergehen kann.

Daher findet man bei Katzen, die gegen den Katzenschnupfen geimpft sind immer wieder Tiere, die durch spontane Rezidivierung unter klinischen und/oder okulären Symptomen leiden. Zudem reagieren einige Katzen unmittelbar nach der Impfung gegen den Katzenschnupfenkomplex mit geringgradigen Symptomen, die dem Katzenschnupfen ähnlich sind [Dawson and Gaskell, 1993].

Die Frage stellt sich nun, ob eine latente FeHV-1-Infektion durch Vakzinierung reaktiviert werden kann. Ziel dieser Studie war deshalb festzustellen, ob eine Vakzinierung latent FeHV-1 infizierter Katzen möglicherweise zu einer Reaktivierung des latenten FeHV-1 führen kann.

Der Einsatz eines GFP-markierten rekombinanten FeHV-1 (rFeHV Δ gG) ermöglichte zu unterscheiden, ob es sich um das Wildtypvirus aus der Primärinfektion oder um das rekombinante Impfvirus handelte.

Das rFeHV Δ gG wurde lokal am Auge verabreicht, da dies dem natürlichen Infektionssort des FeHV-1 entspricht.

6.4.1 Klinik

Der Allgemeinzustand der Katzen blieb während des ganzen Versuchs unverändert. Nicht objektivierbare klinische Augensymptome, wie leichtgradige Epiphora oder minimale Hyperämie der Bindehaut konnten bei einzelnen Katzen in beiden Augen vorübergehen festgestellt werden. Jedoch ist die Hyperämie vorsichtig zu interpretieren, da sie auch im Zusammenhang mit der erniedrigten Tränenproduktion in Narkose auftreten kann [Collins et al., 1995; Vestre et al., 1979]. Im Gegensatz zur Applikation des rekombinanten Impfvirus zeigten dieselben Katzen bei der Primärinfektion mit einem Feldstamm des FeHV-1 ein beeinträchtigtes Allgemeinbefinden sowie typische Augenveränderungen während einigen Wochen (Blepharospasmus, Epiphora, Konjunktivitis, Keratitis) [Gaskell and Povey, 1979b; Haid et al., 2006; Hickman et al., 1994; Hoover et al., 1970].

6.4.2 Virusausscheidung

Mit Hilfe der Virusisolation auf Zellkultur konnte am Tag 1 post inoculationem bei 4/9 Katzen die Ausscheidung von FeHV-1 nachgewiesen werden. Am Tag 4 post inoculationem war nur noch eine Katze positiv. Da alle CPE-Läsionen in der Zellkultur eine grüne Fluoreszenz aufwiesen, war anzunehmen, dass es sich um das rFeHV Δ gG mit dem exprimierten fluoreszierenden Marker (GFP) handelte. Dies konnte auch anhand einer spezifischen konventionellen PCR von den zugehörigen Zellkulturüberständen zur Unterscheidung der beiden FeHV-1 – Wildtyp und rFeHV Δ gG – bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete eine einzige Probe vom Tag 4 post inoculationem, bei der

mittels PCR keine Herpesvirus-DNA (Wildtyp oder rFeHV Δ gG) nachgewiesen werden konnte.

Unklar ist auch jene Katze, die am Tag 1 post inoculationem zusätzlich auch CPE-Läsionen ohne grüne Fluoreszenz zeigte, was für die Ausscheidung des latenten Wildtyps spricht. Mittels spezifischer PCR von dem Zellkulturüberstand dieser Probe konnte jedoch nur das rFeHV Δ gG nachgewiesen werden – DNA vom Wildtyp konnte hingegen nicht gefunden werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das rFeHV Δ gG den anstelle des Glykoproteins G exprimierten Marker GFP bei seiner Replikation wieder verloren hatte und daher CPE-Läsionen ohne Fluoreszenz die Folge waren. Dies würde auch erklären, warum mittels spezifischer PCR nur das rFeHV Δ gG nachgewiesen werden konnte.

Zur Quantifizierung der Virus-DNA wurde zusätzlich eine TaqMan-PCR durchgeführt. Ein Vorteil der TaqMan-PCR ist, dass sie wesentlich sensitiver ist als die Virusisolation auf Zellkultur [Reubel et al., 1993; Sykes et al., 1997; Vogtlin et al., 2002]. Die Proben aus dem jeweiligen Kontrollauge (linkes Auge) waren immer negativ. Am Tag 1 post inoculationem konnte man jeweils im rechten Auge (Ort der Infektion bzw. Vakzination) aller Katzen Virus-DNA feststellen, jedoch wurde nicht sehr viel Virus ausgeschieden (CT-Werte zwischen 31.7 und 20.28). Bei der 2. Probenentnahme am Tag 4 post inoculationem waren noch 6/9 Katzen positiv. Die Virusausscheidung war ebenfalls gering (CT-Werte zwischen 37.75 und 26.44). Danach stellte man von Tag 7 bis Tag 21 post inoculationem keine Virusausscheidung mehr fest. Auch von all diesen in der TaqMan-PCR positiven Proben wurde zusätzlich eine konventionelle spezifische PCR zur Unterscheidung des Wildtyp- und des rekombinanten Virus durchgeführt. Hier konnte ebenfalls nur das rFeHV Δ gG nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu der Primärinfektion mit dem FeHV-1 Wildtyp, wo die CT-Werte während zwei Wochen unter 20 blieben, sind die CT-Werte in der vorliegenden Studie vergleichsweise hoch, d.h. es wurde sehr wenig FeHV-DNA ausgeschieden [Haid et al., 2006]. Auch schieden die Katzen nach der Primärinfektion über längere Zeit (mindestens bis Tag 18 post infectionem) Virus aus, während in dieser Studie schon am Tag 4 post inoculationem nicht mehr bei allen Katzen eine Virusausscheidung beobachtet werden konnte und ab Tag 7 post inoculationem bei keiner mehr Virus nachzuweisen war.

Yokoyama et al. wiesen nach der Impfung von Katzen mit zwei verschiedenen rekombinanten FeHV-1 über deutlich längere Zeit (14 bis 32 Tage post vaccinationem) als in der vorliegenden Studie Virus in Auge, Nase und Mund nach [Yokoyama et al., 1996]. Wobei in ihrer Studie die Katzen zuerst geimpft wurden und an Tag 48 post vaccinationem ein Challenge durchgeführt wurde. Auch wurden die Katzen zweimal geimpft (Tag 0 und 21).

Aufgrund ihrer Experimente nahmen Vögtlin et al. an, dass Proben mit einem CT-Wert von 28 oder weniger auch in der Virusisolation positiv sind [Vogtlin et al., 2002]. In dieser Studie wurde diese These in 5 Fällen bestätigt jedoch gab es auch 3 Fälle, die CT-Werte knapp unter 28 (26.44, 27.33 und 27.99) hatten, die Virusisolation aber dennoch negativ war.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass sich das rFeHV Δ gG jeweils im rechten inokulierten Auge bei allen Katzen am Tag 1 post inoculationem und bei einigen Katzen auch am Tag 4 post inoculationem nachweisen liess. Im jeweiligen linken Kontrollauge der Katzen konnte während der Studie kein Virus isoliert werden. Bei

keiner der 9 Katzen konnte während der Versuchsdauer eine Reaktivierung des latenten Wildtyps nachgewiesen werden.

6.4.3 Antikörperbildung

7 Monate nach der Primärinfektion mit dem FeHV-1 Wildtyp wiesen die Katzen Antikörpertiter zwischen 1:60 und 1:240 auf. Bei 8/9 Katzen begann der Antikörperanstieg ab Tag 7 post inoculationem. 14 Tage post inoculationem erreichte bereits eine einzige Katze einen 4-fachen Anstieg des Titers. Bis zum 28. Tag post inoculationem vervierfachten weitere 4/9 Katzen ihren Antikörpertiter. Etwas später konnte dieser Anstieg nochmals bei 2/9 Katzen (Tag 42 und 86) festgestellt werden. 2/9 Katzen erreichten während der ganzen Messzeit (bis Tag 114 post inoculationem) keinen 4-fachen Titeranstieg. Das Antikörpermaximum wurde bei 1/9 Katzen am Tag 28 post inoculationem, bei 3/9 Katzen am Tag 42, bei 3/9 Katzen am Tag 57 und bei einer Katze am Tag 114 nachgewiesen, wobei letztere bereits einen kleineren Peak an Tag 57 aufwies.

Im Vergleich dazu der Antikörperverlauf bei Primärinfektionen: In der vorhergehenden Studie mit den gleichen Katzen zeigten die 4 Kontrolltiere (keine Vorbehandlung mit Interferon) 2 Wochen post infectionem mit dem Wildtyp Serumneutralisationstiter zwischen 1:40 und 1:128 und 10 Wochen post infectionem zwischen 1:20 und 1:56 auf [Haid et al., 2006]. Vögtlin et al. infizierte 10 SPF-Katzen mit je 100 µl vom FeHV-1 Wildtypstamm UT-88 (25 µl in jedes Auge, 25 µl in die Nase und 25 µl in den Mund) [Vogtlin, 2003]. Die Katzen zeigten bei dieser Primärinfektion ab dem Tag 8 post infectionem ansteigende Antikörpertiter, welche das Maximum zwischen Tag 57 und Tag 78 post infectionem erreichten (gemessen mit ELISA). In unserer Studie beginnt der Antikörperanstieg etwas früher, was für eine anamnestiche Immunantwort spricht.

Orr et al impften Katzen intranasal mit einer kommerziellen feline Calicivirus/feline Herpesvirus Impfung [Orr et al., 1980]. Der Antikörperanstieg, der ebenfalls mittels Serumneutralisationstest gemessen wurde, begann erst ab Tag 20 post vaccinationem. Am Tag 79 post vaccinationem zeigten die Tiere serumneutralisierende Antikörpertiter zwischen 1:32 und 1:48. Am selben Tag wurde ein Challenge durchgeführt. Danach stiegen die Antikörpertiter weiter bis sie am Tag 233 post vaccinationem einen Höhepunkt (Titer zwischen 1:64 und 1:192) erreichten. In der vorliegenden Studie war der maximale Antikörpertiter der Katzen deutlich höher (zwischen 1:240 und 1:1120).

Walton und Gillespie stellten bei den meisten ihrer Katzen 5 Monate nach der Primärinfektion Antikörpertiter (mittels Serumneutralisationstest) unter 1:4 fest [Walton and Gillespie, 1970]. Sie wurden nochmals mit dem gleichen Virus infiziert und zeigten innerhalb 7 bzw. 14 Tage deutliche Titeranstiege, was auf eine anamnestiche Antwort zurückgeführt wurde. Lappin et al. stellten in ihrer Studie fest, dass geimpfte Katzen ohne Antikörpertiter (ELISA und Serumneutralisation) beim Challenge trotzdem nicht erkrankten [Lappin et al., 2002]. Es scheint, dass keine oder geringe Antikörpertiter nicht mit einer Empfänglichkeit gegenüber FeHV-1 gleichzusetzen ist. In unserer Studie waren die Antikörpertiter 6 Monate nach der Primärinfektion noch zwischen 1:60 und 1:240.

Allgemein kann man sagen, dass man, wie erwartet, einen deutlichen Titeranstieg nach der Boosterung mit dem Impfvirus rFeHVΔgG nachweisen konnte.

6.4.4 Mx-Protein- bzw. Interferonbildung

Wird eine Zelle mit Virus infiziert, so beginnt diese mit der Produktion von Interferon und antiviral wirksamen Proteinen. Um die Produktion von endogen induziertem Interferon nachweisen zu können, wurde in der vorliegenden Studie während dem Versuch das Mx-Protein im Blut bestimmt. Vor der Infektion mit dem rFeHV Δ gG konnte man bei keiner der Katzen Mx-Protein nachweisen. Bei 8/9 Katzen konnte bereits 1 Tag post inoculationem Mx-Protein im Blut nachgewiesen werden. Lediglich bei 1/9 Katzen konnte erst bei der nächsten Blutentnahme – 7 Tage post inoculationem – Mx-Protein in den Leukozyten nachgewiesen werden. Auffällig war, dass 1/9 Katzen ab Tag 1 post inoculationem durchgehend Mx-Protein produzierte, wohingegen alle anderen Katzen ab Tag 14 negativ waren. Ab Tag 57 bis Tag 114 post inoculationem war bei den meisten Katzen wieder Mx-Protein im Blut nachweisbar.

Wie erwartet produzierten die Katzen schon 1 Tag post inoculationem endogenes Interferon, das man im Blut mittels des Mx-Proteins nachweisen konnte.

Aufgrund der ab Tag 57 post inoculationem plötzlich wieder positiven Mx-Ausscheidung und der wieder ansteigenden Antikörpertiter (bei einigen Katzen ab Tag 72 bzw. 86) wurde eine Virusreaktivierung vermutet. Die Katzen zeigten aber nie Symptome. Da der Immunoblot erst 8 Wochen später durchgeführt wurde, wurden erst am Tag 114 post inoculationem nochmals PCR-Proben bei allen Katzen entnommen. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei keinem Tier im Tränensekret FeHV-1-DNA nachgewiesen werden. Eine subklinische Reaktivierung um den Tag 57 post inoculationem kann also nicht ausgeschlossen werden.

6.4.5 Fazit

Nach der Inokulation mit dem rFeHV Δ gG erfolgte ein anamnestischer Antikörperanstieg gegen FeHV-Antigene, die Tiere zeigten keine klinischen oder okulären Symptome und es konnte keine Ausscheidung des Wildtypvirus nachgewiesen werden. Damit wurde unsere erste Hypothese, dass der potentielle Impfstoff (rFeHV Δ gG) bei latent FeHV-1 infizierten Katzen gut verträglich ist, bestätigt. Die zweite Hypothese, dass das latente FeHV-1 reaktiviert wird, wurde jedoch nicht gestützt. Eine Untersuchung auf den Verlauf der Anti-Glykoprotein G-Antikörper soll einen besseren Einblick in diese Problematik ermöglichen.

Dies sind gute Voraussetzungen für die Entwicklung eines Impfstoffes. Bei einer Katze wurde am Tag 1 post inoculationem in der Zellkultur sowohl CPE-Läsionen ohne Fluoreszenz als auch mit grüner Fluoreszenz festgestellt, jedoch konnte in der spezifischen PCR nur das Impfvirus rFeHV Δ gG nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das rFeHV Δ gG den anstelle des Glykoproteins G exprimierten Marker GFP bei seiner Replikation wieder verloren hatte. Andererseits wäre es auch möglich, dass gleichzeitig eine Infektion mit Caliciviren stattgefunden hatte. Zur Unterscheidung des Wildtypvirus und des rekombinanten FeHV-1 in Zellkultur ist es wichtig, dass der Marker (GFP) des rekombinanten Virus stabil ist. Diese Stabilität muss noch weiter getestet werden. Der Vorteil dieses rekombinanten Impfvirus (rFeHV Δ gG) wäre, dass es mit der Virusisolation, der PCR und der Serologie vom Wildtypvirus unterscheidbar wäre.

Zusammenfassend haben wir in dieser Studie nachgewiesen, dass der potentielle Impfstoff rFeHV Δ gG in Katzen, die latent mit dem FeHV-1 infiziert sind, keine klini-

schen Symptome auslöst, einen Antikörperanstieg bewirkt und zu keiner Reaktivierung des latenten Virus führt.

Nun wäre es noch interessant, einen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zu entwickeln, der Anti-Glykoprotein G-Antikörper detektiert, um zwischen einer Immunantwort auf das rekombinante Impfvirus (rFeHV Δ gG) und jener auf den Wildtyp unterscheiden zu können. Weiterhin wäre in einem Challenge-Versuch abzuklären, inwieweit Katzen nach okulärer Vakzinierung mit rFeHV Δ gG gegen eine Infektion mit einem Wildtyp FeHV-1 geschützt sind.

7 Literaturverzeichnis

- Abghari, S.Z., Stulting, R.D.**, 1988, Recovery of herpes simplex virus from ocular tissues of latently infected inbred mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29, 239-243.
- Akova, Y.A., Dutt, J., Rodriguez, A., Jabbur, N., Foster, C.S.**, 1993, The role of Igh-1 disparate congenic mouse T lymphocytes in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *Curr Eye Res* 12, 1093-1101.
- Bartholomew, P.T., Gillespie, J.H.**, 1968, Feline viruses. I. Characterization of four isolates and their effect on young kittens. *Cornell Vet* 58, 248-265.
- Bistner, S.I., Carlson, J.H., Shively, J.N., Scott, F.W.**, 1971, Ocular manifestations of feline herpesvirus infection. *J Am Vet Med Assoc* 159, 1223-1237.
- Bittle, J.L., Peckham, J.C.**, 1971, Genital infection induced by feline rhinotracheitis virus and effects on newborn kittens. *J Am Vet Med Assoc* 158, Suppl 2:927-928.
- Bittle, J.L., Rubic, W.J.**, 1974, Studies of feline viral rhinotracheitis vaccine. *Vet Med Small Anim Clin* 69, 1503-1505.
- Bittle, J.L., Rubic, W.J.**, 1975, Immunogenic and protective effects of the F-2 strain of feline viral rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 36, 89-91.
- Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., Alcami, A.**, 2003, Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *Embo J* 22, 833-846.
- Burgener, D.C., Maes, R.K.**, 1988, Glycoprotein-specific immune responses in cats after exposure to feline herpesvirus-1. *Am J Vet Res* 49, 1673-1676.
- Bürki, F., Lindt, S., Freudiger, U.**, 1964, Enzootischer virusbedingter Katzenschnupfen in einem Tierheim. 2. Mitteilung: Virologischer und experimenteller Teil. *Zentralblatt Veterinarmedizin B* 11, 110-118.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C.**, 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Cocker, F.M., Gaskell, R.M., Newby, T.J., Gaskell, C.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J.**, 1984, Efficacy of early (48 and 96 hour) protection against feline viral rhinotracheitis following intranasal vaccination with a live temperature sensitive mutant. *Vet Rec* 114, 353-354.
- Collins, B.K., Gross, M.E., Moore, C.P., Branson, K.R.**, 1995, Physiologic, pharmacologic, and practical considerations for anesthesia of domestic animals with eye disease. *J Am Vet Med Assoc* 207, 220-230.
- Costes, B., Ruiz-Arguello, M.B., Bryant, N.A., Alcami, A., Vanderplasschen, A.**, 2005, Both soluble and membrane-anchored forms of Felid herpesvirus 1 glycoprotein G function as a broad-spectrum chemokine-binding protein. *J Gen Virol* 86, 3209-3214.
- Crandell, R.A.**, 1971, Virologic and immunologic aspects of feline viral rhinotracheitis virus. *J Am Vet Med Assoc* 158, Suppl 2:922-926.
- Crandell, R.A.**, 1973, Feline viral rhinotracheitis (FVR). *Adv Vet Sci Comp Med* 17, 201-224.
- Crandell, R.A., Fabricant, C.G., Nelson-Rees, W.A.**, 1973, Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro* 9, 176-185.
- Crandell, R.A., Maurer, F.D.**, 1958, Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med* 97, 487-490.
- Crandell, R.A., Rehkemper, J.A., Niemann, W.H., Ganaway, J.R., Maurer, F.D.**, 1961, Experimental feline viral rhinotracheitis. *J Chronic Dis* 138, 191-196.
- Davis, E.V., Beckenhauer, W.H.**, 1976, Studies on the safety and efficacy of an intranasal feline rhinotracheitis-calici virus vaccine. *Vet Med Small Anim Clin* 71, 1405-1410.
- Dawson, D.A., Carman, J., Collins, J., Hill, S., Lappin, M.R.**, 1998, Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of feline herpesvirus 1 IgG in serum, aqueous humor, and cerebrospinal fluid. *J Vet Diagn Invest* 10, 315-319.
- Dawson, S., Gaskell, R.M.**, 1993, Problems with respiratory virus vaccination in cats. *Compendium of continuing education Pract Vet* 15, 1347-1354.
- Ditchfield, J., Grinyer, I.**, 1965, Feline Rhinotracheitis Virus: A Feline Herpesvirus. *Virology* 26, 504-506.
- Edwards, B.G., Buell, D.J., Acree, W.M.**, 1977, Evaluation of a new feline rhinotracheitis virus vaccine. *Vet Med Small Anim Clin* 72, 205-209.
- Ellis, T.M.**, 1981, Feline respiratory virus carriers in clinically healthy cats. *Aust Vet J* 57, 115-118.

- Ellis, T.M.**, 1982, Feline viral rhinotracheitis virus: explant and cocultivation studies on tissues collected from persistently infected cats. *Res Vet Sci* 33, 270-274.
- Ettinger, S.J., Feldman, E.C.**, 2005, Textbook of Veterinary Internal Medicine, Vol 1, 6. Ausgabe Edition, 612-615/667-669 pp.
- Galle, L.E.**, 2004, Antiviral therapy for ocular viral disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34, 639-653.
- Gaskell, R.M., Bennett, M.**, 1996, Feline infectious respiratory disease, 3-28 pp.
- Gaskell, R.M., Dennis, P.E., Goddard, L.E., Cocker, F.M., Wills, J.M.**, 1985, Isolation of felid herpesvirus 1 from the trigeminal ganglia of latently infected cats. *J Gen Virol* 66 (Pt 2), 391-394.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C.**, 1973, Re-excretion of feline viral rhinotracheitis virus following corticosteroid treatment. *Vet Rec* 93, 204-205.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C.**, 1977, Experimental induction of feline viral rhinotracheitis virus re-excretion in FVR-recovered cats. *Vet Rec* 100, 128-133.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C.**, 1979a, The dose response of cats to experimental infection with feline viral rhinotracheitis virus. *J Comp Pathol* 89, 179-191.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C.**, 1979b, Feline viral rhinotracheitis: sites of virus replication and persistence in acutely and persistently infected cats. *Res Vet Sci* 27, 167-174.
- Gaskell, R.M., Povey, R.C.**, 1982, Transmission of feline viral rhinotracheitis. *Vet Rec* 111, 359-362.
- Haid, C., Schudel, L., Goenczi, E., Hässig, M., Metzler, A., Spiess, B.M., Richter, M.**, 2006, Prophylactic treatment of cats with feline interferon omega and the course of subsequent infection with feline herpesvirus. *J Am Vet Med Assoc*, submitted december 2005.
- Hargis, A.M., Ginn, P.E.**, 1999, Feline herpesvirus 1-associated facial and nasal dermatitis and stomatitis in domestic cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 1281-1290.
- Hickman, M.A., Reubel, G.H., Hoffman, D.E., Morris, J.G., Rogers, Q.R., Pedersen, N.C.**, 1994, An epizootic of feline herpesvirus, type 1 in a large specific pathogen-free cat colony and attempts to eradicate the infection by identification and culling of carriers. *Lab Anim* 28, 320-329.
- Hoover, E.A., Griesemer, R.A.**, 1971, Experimental feline herpesvirus infection in the pregnant cat. *Am J Pathol* 65, 173-188.
- Hoover, E.A., Rohovsky, M.W., Griesemer, R.A.**, 1970, Experimental feline viral rhinotracheitis in the germfree cat. *Am J Pathol* 58, 269-282.
- Huang, J., Hartley, C.A., Ficorilli, N.P., Crabb, B.S., Studdert, M.J.**, 2005, Glycoprotein G deletion mutants of equine herpesvirus 1 (EHV1; equine abortion virus) and EHV4 (equine rhinopneumonitis virus). *Arch Virol*.
- Johnson, R.P., Povey, R.C.**, 1985, Vaccination against feline viral rhinotracheitis in kittens with maternally derived feline viral rhinotracheitis antibodies. *J Am Vet Med Assoc* 186, 149-152.
- Kaerber, G.**, 1931, Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 162, 480.
- Karpas, A., Routledge, J.K.**, 1968, Feline herpes virus: isolations and experimental studies. *Zentralbl Veterinarmed B* 15, 599-606.
- Kraft, W., Dürr, U.**, 2003, Katzenkrankheiten Klinik und Therapie, Vol 1, 5. Auflage Edition, 206-227 pp.
- Kramer, J.W., Evermann, J.F., Leathers, C.W., McKeirnan, A.J., Rashti, L.**, 1991, Experimental infection of two dogs with a canine isolate of feline herpesvirus type 1. *Vet Pathol* 28, 338-340.
- Lappin, M.R., Andrews, J., Simpson, D., Jensen, W.A.**, 2002, Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 220, 38-42.
- Lindt, S.**, 1965, Zur Morphologie und Ätiologie der Erkrankungen des oberen Respirationstraktes bei Katzen. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 107, 196-203.
- Maggs, D.J., Nasisse, M.P., Kass, P.H.**, 2003, Efficacy of oral supplementation with L-lysine in cats latently infected with feline herpesvirus. *Am J Vet Res* 64, 37-42.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B., Wittmann, G.**, 1974, Virologische Arbeitsmethoden, Vol Band 1. VEB Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Muller-Doblies, D., Ackermann, M., Metzler, A.**, 2002, In vitro and in vivo detection of Mx gene products in bovine cells following stimulation with alpha/beta interferon and viruses. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 1192-1199.
- Nasisse, M.P.**, 1982, Manifestations, diagnosis and treatment of ocular herpesvirus infection in the cat. *Compendium of continuing education Pract Vet* 4, 962-970.
- Nasisse, M.P.**, 1990, Feline herpesvirus ocular disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 20, 667-680.

- Nasise, M.P., Davis, B.J., Guy, J.S., Davidson, M.G., Sussman, W.**, 1992, Isolation of feline herpesvirus 1 from the trigeminal ganglia of acutely and chronically infected cats. *J Vet Intern Med* 6, 102-103.
- Nasise, M.P., English, R.V., Tompkins, M.B., Guy, J.S., Sussman, W.**, 1995, Immunologic, histologic, and virologic features of herpesvirus-induced stromal keratitis in cats. *Am J Vet Res* 56, 51-55.
- Nasise, M.P., Glover, T.L., Moore, C.P., Weigler, B.J.**, 1998, Detection of feline herpesvirus 1 DNA in corneas of cats with eosinophilic keratitis or corneal sequestration. *Am J Vet Res* 59, 856-858.
- Nasise, M.P., Guy, J.S.**, 1989, Feline ocular disease and rhinotracheitis virus. *Vet Med Rep* 1, 155-165.
- Nasise, M.P., Guy, J.S., Davidson, M.G., Sussman, W., De Clercq, E.**, 1989a, In vitro susceptibility of feline herpesvirus-1 to vidarabine, idoxuridine, trifluridine, acyclovir, or bromovinyldeoxyuridine. *Am J Vet Res* 50, 158-160.
- Nasise, M.P., Guy, J.S., Davidson, M.G., Sussman, W.A., Fairley, N.M.**, 1989b, Experimental ocular herpesvirus infection in the cat. Sites of virus replication, clinical features and effects of corticosteroid administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1758-1768.
- Orr, C.M., Gaskell, C.J., Gaskell, R.M.**, 1978, Interaction of a combined feline viral rhinotracheitis-feline calicivirus vaccine and the FVR carrier state. *Vet Rec* 103, 200-202.
- Orr, C.M., Gaskell, C.J., Gaskell, R.M.**, 1980, Interaction of an intranasal combined feline viral rhinotracheitis, feline calicivirus vaccine and the FVR carrier state. *Vet Rec* 106, 164-166.
- Povey, R.C.**, 1969, Viral respiratory disease. *Vet Rec* 84, 335-338.
- Povey, R.C.**, 1979, A review of feline viral rhinotracheitis (feline herpesvirus I infection). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2, 373-387.
- Povey, R.C., Johnson, R.H.**, 1969, A standardized serum neutralization test for feline viral rhinotracheitis. II. The virus-serum system. *J Comp Pathol* 79, 387-392.
- Reubel, G.H., George, J.W., Barlough, J.E., Higgins, J., Grant, C.K., Pedersen, N.C.**, 1992, Interaction of acute feline herpesvirus-1 and chronic feline immunodeficiency virus infections in experimentally infected specific pathogen free cats. *Vet Immunol Immunopathol* 35, 95-119.
- Reubel, G.H., Ramos, R.A., Hickman, M.A., Rimstad, E., Hoffmann, D.E., Pedersen, N.C.**, 1993, Detection of active and latent feline herpesvirus 1 infections using the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 132, 409-420.
- Roizman, B.**, 1991, Introduction: objectives of herpes simplex virus vaccines seen from a historical perspective. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 11, S892-894.
- Sabbaga, E.M., Pavan-Langston, D., Bean, K.M., Dunkel, E.C.**, 1988, Detection of HSV nucleic acid sequences in the cornea during acute and latent ocular disease. *Exp Eye Res* 47, 545-553.
- Scott, F.W.**, 1977, Evaluation of a feline viral rhinotracheitis-feline calicivirus disease vaccine. *Am J Vet Res* 38, 229-234.
- Scott, F.W., Geissinger, C.M.**, 1999, Long-term immunity in cats vaccinated with an inactivated trivalent vaccine. *Am J Vet Res* 60, 652-658.
- Stiles, J.**, 2000, Feline herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 30, 1001-1014.
- Stiles, J., McDermott, M., Bigsby, D., Willis, M., Martin, C., Roberts, W., Greene, C.**, 1997, Use of nested polymerase chain reaction to identify feline herpesvirus in ocular tissue from clinically normal cats and cats with corneal sequestra or conjunctivitis. *Am J Vet Res* 58, 338-342.
- Streilein, J.W., Dana, M.R., Ksander, B.R.**, 1997, Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today* 18, 443-449.
- Sussman, M.D., Maes, R.K., Kruger, J.M.**, 1997, Vaccination of cats for feline rhinotracheitis results in a quantitative reduction of virulent feline herpesvirus-1 latency load after challenge. *Virology* 228, 379-382.
- Sykes, J.E., Browning, G.F., Anderson, G., Studdert, V.P., Smith, H.V.**, 1997, Differential sensitivity of culture and the polymerase chain reaction for detection of feline herpesvirus 1 in vaccinated and unvaccinated cats. *Arch Virol* 142, 65-74.
- Tham, K.M., Studdert, M.J.**, 1987, Clinical and immunological responses of cats to feline herpesvirus type 1 infection. *Vet Rec* 120, 321-326.
- Trapp, S., Osterrieder, N., Keil, G.M., Beer, M.**, 2003, Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J Gen Virol* 84, 301-306.
- Vestre, W.A., Brightman, A.H., 2nd, Helper, L.C., Lowery, J.C.**, 1979, Decreased tear production associated with general anesthesia in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 174, 1006-1007.

- Vogtlin, A.**, 2003. Pathogenesis of Herpetic Stromal Keratitis (HSK) in Cats and Developement of Therapeutic Applications. PhD. Tierspital, Universität Zürich, Zürich.
- Vogtlin, A., Fraefel, C., Albin, S., Leutenegger, C.M., Schraner, E., Spiess, B., Lutz, H., Ackermann, M.**, 2002, Quantification of feline herpesvirus 1 DNA in ocular fluid samples of clinically diseased cats by real-time TaqMan PCR. *J Clin Microbiol* 40, 519-523.
- Walton, T.E., Gillespie, J.H.**, 1970, Feline viruses. VII. Immunity to the feline herpesvirus in kittens inoculated experimentally by the aerosol method. *Cornell Vet* 60, 232-239.
- Yamamoto, J.K., Hansen, H., Ho, E.W., Morishita, T.Y., Okuda, T., Sawa, T.R., Nakamura, R.M., Pedersen, N.C.**, 1989, Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J Am Vet Med Assoc* 194, 213-220.
- Yokoyama, N., Maeda, K., Fujita, K., Ishiguro, S., Sagawa, T., Mochizuki, M., Tohya, Y., Mikami, T.**, 1996, Vaccine efficacy of recombinant feline herpesvirus type 1 expressing immunogenic proteins of feline calicivirus in cats. *Arch Virol* 141, 2339-2351.
- Yokoyama, N., Maeda, K., Mikami, T.**, 1997, Recombinant viral vector vaccines for the veterinary use. *J Vet Med Sci* 59, 311-322.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Spiess danke ich für die Übernahme des Referates.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. M. Ackermann für das Korreferat und die Beratung während der Planung des Projektes.

Bei Dr. Marianne Richter bedanke ich mich für die Leitung dieses Projekts, die freundschaftliche Beratung und das Belassen vieler Freiheiten.

Ich möchte mich auch bei den Leuten bedanken, die mich mit guten Tipps bei der Laborarbeit unterstützt haben. Dies sind Dr. Sandra Theise (Ophthalmologie) und Dr. Enikő Gönczi sowie Dr. Marina Meli (Veterinärmedizinisches Labor).

Herrn Dr. Kurt Tobler (Virologischen Institut) danke ich für die Hilfe beim Verarbeiten von einem Teil der Proben und die Unterstützung bei virologischen Fragen.

Auch Marychelo Rios bin ich für die fürsorgliche und liebevolle Betreuung der Katzen dankbar.

Bei Claudia und Céline bedanke ich mich herzlich für die vielen heiteren aber auch ernsten Gespräche in „unserem“ Büro.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle meine Freunde, die mit mir den Doktorandenalltag geteilt oder mich sonst unterstützt haben:

Daniela Meier, Marcel Schäubli, Corinne Bosshard und Olivier Schenker, Franca Rigonalli und Monika Jehli.

Bei den Hulmenhöflern möchte ich mich für die vielen schönen Plauderritte bedanken, die ich während meiner Studien- und Doktorandenzeit besonders genossen habe.

Zum Schluss danke ich ganz herzlich meiner Familie. Durch die Unterstützung und Geduld meiner Eltern war es mir überhaupt möglich das Studium und die Doktorarbeit abzuschliessen.

Lebenslauf

Name	Lea Schudel
Geburtsdatum	21.05.1977
Nationalität	Schweizerin
Heimatort	Wiesendangen/ZH
1984-1990	Primarschule Wiesendangen
1990-1997 1997	Kantonsschule Rychenberg Winterthur Matura Typus B
1997-2004 Juni 2004	Veterinärmedizinstudium Universität Zürich Staatsexamen Universität Zürich
Okt. 2004 – Nov. 2005	Dissertation, Universität Zürich